

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

UNIDAD DE POST-GRADO

**Actividad Antifúngica In Vitro y Concentración
Mínima Inhibitoria mediante Microdilución de ocho
plantas medicinales**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Microbiología

AUTOR

Julio Reynaldo Ruiz Quiroz

ASESOR

Mg. Mirtha Roque Alcarraz

Lima – Perú

2013



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

UNIDAD DE POSGRADO



**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR
AL GRADO ACADÉMICO DE MAGISTER EN MICROBIOLOGÍA**

Siendo las 12.00 horas del lunes 04 de febrero 2013 se reunieron en el Auditorio de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, el Jurado Examinador y Calificador, presidido por el Dr. Gerardo Gamarra Ballena e integrado por los siguientes miembros: Dr. Américo Jorge Castro Luna, Mg. Víctor Crispín Pérez, Mg. Mirtha Roque Alcarraz y Mg. María Elena Salazar Salvatierra; para la sustentación oral y pública de la Tesis intitulada: **"ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA *IN VITRO* y CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA MEDIANTE MICRODILUCIÓN DE OCHO PLANTAS MEDICINALES"**, del Bachiller en Farmacia y Bioquímica **JULIO REYNALDO RUIZ QUIROZ**, egresado de la Maestría en Microbiología.

Acto seguido se procedió a la exposición de la Tesis, con el fin de optar al Grado Académico de Magister en Microbiología. Formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por el graduando.

A continuación el Jurado Examinador y Calificador procedió a la votación, la que dio como resultado el siguiente calificativo:


DIECINUEVE (19) EXCELENTE

Luego, el Presidente del Jurado recomienda que la Facultad proponga que se le otorgue al Bachiller en Farmacia y Bioquímica **JULIO REYNALDO RUIZ QUIROZ**, el Grado Académico de Magister en Microbiología.


Siendo las 13:50 hrs. se levanta la sesión.

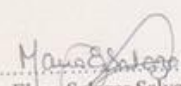
Se extiende el acta en Lima, a las 14:00 hrs. del 04 de febrero 2013.


Dr. Gerardo Gamarra Ballena (P.P., T.C.)
Presidente


Dr. Américo Jorge Castro Luna (P.P., D.E.)
Miembro


Mg. Víctor Crispín Pérez (P.P., T.P.)
Miembro


Mg. Mirtha Roque Alcarraz (P.Asoc., T.C.)
Miembro


Mg. María Elena Salazar Salvatierra (P.Asoc., T.C.)
Miembro

Observaciones:

JURADO EXAMINADOR

DR. GERARDO GAMARRA BALLENA	PRESIDENTE
DR. AMÉRICO JORGE CASTRO LUNA	MIEMBRO
DR. VÍCTOR CRISPÍN PÉREZ	MIEMBRO
MG. MIRTHA ROQUE ALCARRAZ	MIEMBRO
MG. MARÍA ELENA SALAZAR SALVATIERRA	MIEMBRO

ASESOR DE TESIS

MG. MIRTHA ROQUE ALCARRAZ

PROFESORA ASOCIADA

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

DEDICATORIA

A Dios nuestro más importante guía, por haberme dado la vida y el valor necesario para afrontarla

A mis padres Gladys Elena y Hugo Anibal, por su apoyo incondicional durante mi formación profesional, ya que ellos fueron mis dos guías que lograron hacer de mí un profesional

A mi hermana Ana, mis sobrinos Piero, Kimberly y Fátima, tios, primos, cuñado y toda la familia, por su apoyo.

AGRADECIMIENTOS

A la Mg. Mirtha Roque Alcarraz, por su amistad, sus valiosos consejos y el tiempo dedicado, muchas gracias.

Al Dr. José Irej, Dr. Gerardo Gamarra, Dr. Víctor Crispín y Dra. María Salazar por su apoyo y consejos académicos y personales.

A todos los docentes de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, que me apoyaron de una u otra forma para la realización de la tesis

A mis amigos promociones de ingresos a la docencia: Mg. Yadira Fernandez, Dra. Ana Muñoz y Mg. Francisco Ramirez, por su constante apoyo y empuje para culminar la tesis.

A mis amigos Emerson, Julian, Robert, Esmelín, Vanessa, Nino, Hugo, Karla, Elizabeth, Rocio, Giovanna y Juvissan por su valioso apoyo y amistad.

INDICE

	Pág.
RESUMEN	2
SUMMARY	3
INTRODUCCIÓN	4
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	5
1.1 Antecedentes	5
1.2 Problema	8
1.3 Objetivos	9
1.4 Justificación	9
1.5 Alcances y Limitaciones	10
1.6 Variables	10
2. MARCO TEÓRICO	11
2.1 Teorías Generales:	11
Hongos	11
Micosis	12
Plantas medicinales	15
2.2 Bases Teóricas:	17
Plantas medicinales con actividad antifúngica	17
Determinación in vitro de la actividad antifúngica	19
2.3 Marco Conceptual:	21
Plantas medicinales en estudio	21
2.4 Hipótesis	33
3. MATERIALES Y METODOS	34
4. RESULTADOS	43
5. DISCUSIÓN	57
6. CONCLUSIONES	64
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
8. ANEXOS	78

RESUMEN

Se determinó la actividad antifúngica *in vitro* de los extractos metanólicos, etanólicos e hidroalcohólicos de *Hypericum laricifolium* (partes aéreas), *Ilex guayusa* Loes (hojas), *Juglans neotropica* Diels (corteza), *Piper lineatum* (hojas), *Piper spp.* (hojas), *Psidium guajava* (hojas), *Cassia reticulata* Wild (planta entera) y *Terminalia catappa* (hojas); recolectadas en los departamentos de Amazonas y Cajamarca. La actividad antifúngica se evaluó mediante el método de difusión en agar frente a *Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus niger* ATCC 16404 y *Microsporum canis* cepa clínica y la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) por el método de microdilución colorimétrico, utilizando como controles ketoconazol y fluconazol.

Todos los extractos presentaron actividad antifúngica importante frente a *C. albicans* y *M. canis*, y ninguno tuvo actividad frente a *A. niger*. Las condiciones de laboratorio para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de *C. albicans* mediante el método de microdilución colorimétrico fueron: temperatura de incubación de 37°C, tiempo de incubación de 24 h, inóculo final $0,5-2,5 \times 10^3$ ufc/mL y 0,05 mg de resazurina por pozo; y, para *M. canis* fueron temperatura de incubación de 37°C, tiempo de incubación de 4 días, inóculo final de $1,2 - 6 \times 10^4$ ufc/mL y 0,05 mg de resazurina por pozo.

Mediante microdilución se determinó que 19 (79%), 18 (75%) y 24 (100 %) de los extractos investigados presentaron CMIs ≤ 1000 µg/mL, frente a *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida albicans* cepa clínica y *Microsporum canis*, respectivamente. Los extractos con la mayor actividad antifúngica fueron los de *Juglans neotropica* Diels, *Psidium guajava* y *Terminalia catappa*; con CMIs < 100 µg/mL. El método de microdilución colorimétrico usando resazurina demostró ser útil para el screening antifúngico de extractos de plantas.

Palabras clave: Actividad antifúngica, plantas medicinales, Amazonas, microdilución colorimétrica, concentración mínima inhibitoria, *Candida albicans* ATCC 10231, *Microsporum canis*, *Aspergillus niger* ATCC 16440

SUMMARY

I was determined the *in vitro* antifungal activity of ethanolic, methanolic and hydro-alcoholic extracts of *Hypericum laricifolium* (aerial parts), *Ilex guayusa* (leaves), *Juglans neotropica* Diels (bark), *Piper spp.* (leaves), *Piper lineatum* (leaves), *Psidium guajava* (leaves), *Cassia reticulata* Wild (whole plant) and *Terminalia catappa* (leaves); collected in the departments of Amazonas and Cajamarca. The antifungal activity was evaluated by the agar diffusion method against *Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus niger* ATCC 16404, and the dermatophyte *Microsporum canis* clinical strain and the Minimum Inhibitory Concentration (CMI) by the microdilution colorimetric method, using as controls ketoconazole and fluconazole.

All of extracts showed antifungal activity against *C. albicans* and *M. canis* and no activity against *Aspergillus niger*. The laboratory conditions to determine the Minimum Inhibitory Concentration (CMI) of *Candida albicans* through the colorimetric microdilution method were: incubation temperature of 37°C, time of incubation of 24 h, final inoculums $0,5-2,5 \times 10^3$ cfu/mL and 0,05 mg de resazurin per well; and, for *Microsporum canis* were: incubation temperature of 37°C, time of incubation of 4 days, final inoculums $1,2-6 \times 10^4$ cfu/mL and 0,05 mg de resazurin per well.

For microdilution were determined that 19 (79%), 18 (75%) y 24 (100%) of extracts investigated, showed MICs ≤ 1000 µg/mL, against *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida albicans* clinic strain and *Microsporum canis* respectively. The extracts with the best antifungal activity were those *Juglans neotropica* Diels, *Psidium guajava* and *Terminalia catappa*; with MICs < 100 µg/mL. The colorimetric microdilution method using resazurin proved useful for screening antifungal plant extracts.

Key words: Antifungal activity, medicinal plants, Amazonas, colorimetric microdilution, Minimal Inhibitory Concentration, *Candida albicans* ATCC 10231, *Microsporum canis*, *Aspergillus niger* ATCC 16404.

INTRODUCCIÓN

Durante los últimos años se ha incrementado la incidencia de enfermedades fúngicas⁽¹⁾, el aumento considerable de pacientes inmunocomprometidos, quimioterapia, nutrición parenteral, cirugía de transplante y el uso de agentes antimicrobianos de amplio espectro, agregados a la presencia de SIDA, dan verdaderas "placas petri vivientes" individuales, quienes son altamente susceptibles a las infecciones oportunistas. Las infecciones fúngicas sistémicas y dérmicas son la causa de gran morbi-mortalidad en este tipo de pacientes, siendo la dermatomicosis un problema serio para niños de países en desarrollo como una consecuencia de un cuidado sanitario deficiente ⁽²⁾.

Los fármacos disponibles actualmente, tiene una toxicidad importante, producen recurrencia o causan resistencia, razón por la cual se está procurando nuevos agentes antifúngicos más potentes pero sobretodo más seguros que los existentes actualmente. Desafortunadamente, las células fúngicas y humanas no son muy diferentes, comparten gran parte de las vías del metabolismo intermediario, utilizan enzimas muy similares y no es fácil encontrar blancos que ofrezcan la selectividad requerida para obtener un antifúngico seguro ^(3, 4).

Los compuestos derivados de plantas son de interés en este contexto porque ellos comprenden sustitutos más seguros o más eficaces como fuente de agentes antimicrobianos que los producidos en la industria ^(5, 6, 7).

La Amazonía peruana es una de las zonas del planeta con mayor diversidad vegetal: conviven en la zona el 8% del total de especies vegetales, de las cuales menos del 1% han sido estudiadas desde el punto de vista fitoquímico o farmacológico, por lo tanto su estudio podría conducir al descubrimiento de un gran número de nuevas moléculas bioactivas con posible aplicación terapéutica. Los indígenas de la amazonía peruana disponen de conocimientos transmitidos de generación en generación sobre las aplicaciones medicinales de las plantas que pueblan la zona ⁽⁸⁾. Por esta razón, luego de un análisis etnobotánico y quimio-taxonómico fueron seleccionadas 8 plantas para el estudio: *Hypericum laricifolium* ^(9 y 10), *Ilex guayusa* Loes ^(11 y 12), *Juglans neotropica* Diels ^(13 y 14), *Piper lineatum*, *Piper spp.* ^(15 y 16), *Psidium guajava* ⁽¹⁷⁾, *Senna reticulata* Wild ^(18 y 19), y *Terminalia catappa* ^(20 y 21).

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1. Antecedentes

Como primer paso en esta investigación hemos recopilado trabajos y estudios relacionados a la búsqueda y determinación de la actividad antifúngica de plantas medicinales, en especial aquellas cuyos géneros vegetales se encuentran en el Perú.

1.1.1. En el Ámbito Internacional

Tchakam PD. et al. (2012) reportaron que el extracto metanólico de las hojas de *Hypericum lanceolatum* tiene una CMI de 512 µg/mL contra *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans* y de 64 µg/mL contra *Trichophyton rubrum*, determinados por el método de microdilución en caldo ⁽²²⁾.

Fenner R. et al. (2005) han encontrado que los extractos clorofórmico y de eter de petróleo de *Hypericum terneum* tienen actividad contra *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*, y dermatofitos con CMIs entre 100 y 500 µg/mL, determinado por el método de dilución en agar ⁽¹⁰⁾; en otro estudio Decosterd LA. et al. (1991) señalan que del extracto de eter de petróleo de las partes aéreas de *Hypericum calycinum* se aisló un derivado de floroglucinol que posee actividad antifúngica contra *Cladosporium cucumericum* ⁽²³⁾.

Rath G. et al. (1996) mencionan que las xantonas aisladas de la raíz de *Hypericum roeperanum* exhiben actividad antifúngica contra *Candida albicans* ⁽²⁴⁾. En otro estudio Rocha L. et al. (1994) reportaron que la hiperbrasilona y xantonas aisladas del extracto de diclorometano de la corteza y raíz de *Hypericum brasiliense* mostraron actividad contra *Cladosporium cucumericum* ⁽²⁵⁾. Además Mukherjee PK. et al. (2002) encontraron que los extractos clorofórmico y metanólico de las hojas y cortezas de *Hypericum patulum* e *Hypericum mysorensense* mostraron un efecto antifúngico comparable a la griseofulvina ⁽²⁶⁾.

Filip R. et al. (2010) demostraron que el extracto acuoso de *Ilex paraguariensis* (1000 mg/mL) posee actividad inhibitoria contra *Malassezia furfur*, hongo causante de la pitiriasis versicolor ⁽²⁷⁾. En otro estudio Haraguchi H. et al. (1999) han reportado que los triterpenos aislados de las frutas de *Ilex integra* mostrarán actividad contra *Candida*

albicans y *Aspergillus niger*, con CMI de 50 µg/mL y 200 µg/mL respectivamente, para el triterpeno más activo ⁽¹²⁾.

Lopez A. et al. (2001) han reportado que el extracto metanólico de *Juglans neotropica* Diels mostró actividad antifúngica ⁽¹⁴⁾. Por otro lado Nuomi E. et al. (2010) reportaron que los extractos de etil acetato, metanólico y de acetona de la corteza de *Juglans regia* mostraron actividad contra *Candida albicans* ⁽²⁸⁾.

Omar S et al. (2000) reportaron que el extracto de la corteza de *Juglans cinerea* mostró actividad contra una amplia variedad de hongos tales como *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum gypseum*, y *Aspergillus fumigatus* ⁽²⁹⁾.

Danelutte AP. et al. (2003) encontraron en las hojas de *Piper crassinervium* Kunth del Brasil hidroquinonas preniladas y las flavononas naringenina y sakuranetina, estos compuestos tuvieron actividades antifúngicas comparables a los controles (Nistatina y Miconazol) ⁽¹⁵⁾. Tirilini B. et al. (1996) reportaron que el canfor y canfeno, principales constituyentes del aceite esencial de *Piper angustifolium* Lam. mostraron actividad fungistática contra *Trichophyton mentagrophytes*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus* ⁽³⁰⁾.

Vasquez da Silva R. et al. (2002), Navickiene HM. et al. (2000) y Alecio AC. et al. (1998) reportaron que han aislado numerosas amidas con actividad antifúngica de semillas y hojas de *Piper tuberculatum*, *Piper arboreum* y de *Piper hispidum* ^(16, 31, 32).

Koroishi AM. et al. (2008) encontraron que el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Piper regnellii* presentó una fuerte actividad contra los dermatofitos *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis* y *Microsporum gypseum* ⁽³³⁾.

Jebashree HS. et al. (2011) reportaron que los extractos hexánico, de etil acetato, etanólico y metanólico de las hojas de *Psidium guajava* mostraron actividad contra *Candida albicans* con una CMI de 0,315 mg/mL ⁽³⁴⁾. Dhiman A. et al. (2011) reportaron que el extracto metanólico de las hojas de *Psidium guajava* mostraron CMI de 12.5 µg/mL contra *Candida albicans* y *Aspergillus niger* ⁽³⁵⁾.

Torey A. et al. (2011) reportaron que el extracto metanólico de *Senna spectabilis* (sinónimo *Cassia spectabilis*) mostró actividad contra *Candida albicans* con una CMI de

6.25 mg/mL, determinado por el método de microdilución y el extracto también redujo biopelículas de *Candida albicans* ⁽³⁶⁾.

Somchit MN et al. (2003) reportaron que el extracto etanólico de la corteza de *Cassia alata* (sinónimo *Senna alata*) mostró actividad contra *Candida albicans* a una concentración de 30 µg/µL ⁽¹⁹⁾; Cáceres A. et al. (1993) reportaron que el extracto etanólico de la corteza y hojas de *Cassia grandis* fue activo contra dermatofitos ⁽³⁷⁾. Por otro lado anteriormente Cáceres et al. (1991), también encontraron que el extracto acuoso de *Cassia grandis* y *Cassia occidentalis* demostraron actividad contra dermatofitos ⁽³⁸⁾.

Carpano SM. et al. (2003) reportaron que el extracto metanólico y acuoso de las partes aéreas de *Terminalia australis*, mostraron efecto contra cepas de *Aspergillus* y *Candida* ⁽²¹⁾. Fyhrquist P. et al. (2002) señalan que el extracto metanólico de la raíz de *Terminalia sambesiaca* y el extracto metanólico de la raíz de *Terminalia sericea* tienen actividad anticandida ⁽³⁹⁾. Baba-Mousa F. et al. (1999) reportaron que la planta de *Terminalia avicennnioides* es rica en taninos y saponinas, lo que explicaría su actividad contra cepas de *Candida* y dermatofitos ⁽⁴⁰⁾. Masoko P. et al. (2005) demostraron que *Terminalia sericea* y *T. brachystemma* originarios de Sudáfrica tienen compuestos antifúngicos de naturaleza apolar (Rf=0.46) contra *Microsporum canis* ⁽⁴¹⁾ y Liu M. et al. (2009) encontró que la punicalagina, tanino aislado de las hojas de *Terminalia brachystemma* mostró una excelente actividad contra 3 especies de *Candida* ⁽⁴²⁾.

1.1.2. En el Ámbito Nacional

El Perú es rico en flora y sólo un pequeño porcentaje (~ 2%) de estas especies peruanas han sido investigadas químicamente y/o biológicamente, y se estima más de 2000 plantas son usadas en la región amazónica por la medicina tradicional. El norte del Perú, particularmente las laderas orientales de las montañas de los andes y la región amazónica adyacente es muy rica en diversidad de plantas leñosas ⁽⁴³⁾. Los departamentos de Amazonas y Cajamarca se ubican en esta región.

Rojas R. et al. (2003) reportaron el estudio de la actividad antimicrobiana de 36 extractos etanólicos de 24 plantas utilizadas en la medicina tradicional peruana para el tratamiento de infecciones severas y desordenes inflamatorios, usando el método de difusión en agar ⁽⁴⁴⁾.

Huamani ME. y Ruiz JR. (2003) reportaron que el extracto etanólico de las partes aéreas de *Hypericum laricifolium* (Chinchango) mostró actividad contra *Candida albicans* ATCC 10231, con un halo de inhibición de 22 mm y una Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de 250 µg/mL ⁽⁹⁾.

De la Cruz P. (2012) reportó que los aceites esenciales de las especies *Piper Carpunya* (Carpundia), *Piper lineatum* (Matico) y *Piper acutifolium* (Matico rojo) tienen propiedades antimicóticas, antioxidantes y antimicrobianas ⁽⁴⁵⁾.

En la amazonia peruana la planta entera de *Senna reticulata* Wild (Retama) se usa para infecciones fúngicas ⁽¹⁸⁾.

Kloucek P. et al. (2005) encontraron que el extracto etanólico de las hojas de *Terminalia catappa* (Castañilla) que se encuentra en la selva peruana tienen actividad contra bacterias Gram positivas y Gram negativas ⁽²⁰⁾.

1.2 Problema

1.2.1. Problema General:

¿Cómo determinar la actividad antifúngica *in vitro* en plantas medicinales y la concentración mínima inhibitoria mediante microdilución en placa?

1.2.2. Problemas Específicos:

- ¿Cómo determinar la actividad antifúngica *in vitro* de los extractos alcohólico, metanólico e hidro-alcohólico de plantas enteras y/o sus partes mediante el método de difusión en placa?
- ¿Cómo determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) *in vitro* de los extractos alcohólico, metanólico e hidro-alcohólico de plantas enteras y/o sus partes con actividad antifúngica mediante el método de microdilución en placa?

1.3 Objetivos

1.3.1. Objetivo General

Determinar la actividad antifúngica *in vitro* en plantas medicinales y la concentración mínima inhibitoria mediante microdilución en placa.

1.3.2. Objetivos Específicos:

1. Determinar la actividad antifúngica *in vitro* de los extractos alcohólico, metanólico e hidro-alcohólico de 8 plantas medicinales mediante el método de difusión en agar.
2. Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) *in vitro* de los extractos alcohólico, metanólico e hidro-alcohólico de plantas con actividad antifúngica por el método de microdilución en placa.
3. Realizar el análisis fitoquímico preliminar de las plantas en estudio.

1.4 Justificación

- a. **Justificación teórica:** determinar la actividad antifúngica de las plantas medicinales representa un problema muy pertinente para su estudio.
- b. **Justificación práctica:** poner en evidencia la actividad antifúngica *in vitro* de las plantas medicinales mediante el diseño de investigación del tipo de estudio que fue planteado representó una investigación de elevada relevancia científica.
- c. **Justificación metodológica:** se deseaba confirmar si la metodología utilizada en este estudio, mediante la determinación de la actividad antifúngica *in vitro* de las plantas medicinales, representó una investigación con un diseño y desarrollo acertados.
- d. **Justificación económica:** el conocimiento de la actividad antifúngica de las plantas medicinales permitirá orientar los estudios en la búsqueda de nuevas alternativas de tratamiento.

1.5 Alcances y Limitaciones

Alcances: los resultados del estudio tienen validez interna para los programas de investigación de productos naturales, en especial para su evaluación de la actividad antimicrobiana en general y antifúngica en particular, teniendo en cuenta la capacidad y equipamiento en la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM; y validez externa porque en el estudio se usaron métodos estandarizados y/o modificados a partir de publicaciones científicas y cumpliendo las exigencias de la investigación científica.

Limitaciones: al trabajar con productos naturales como las plantas existen muchos factores que considerar como: lugar de muestreo, estación del año, hora del muestreo, tipo de extracción, solvente de extracción y la metodología para evaluar la actividad antifúngica; lo que puede influir en la comparación de los resultados con otras investigaciones; además no se abordó en profundidad el estudio fitoquímico de las plantas de estudio porque este se limitó a los objetivos planteados.

1.6 Variables:

Variable dependiente: actividad antifúngica, concentración mínima inhibitoria

Variable independiente: la planta y/o sus partes, método de microdilución en placa

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Teorías Generales

2.1.1. Hongos

Un hongo es un organismo eucariota que es miembro del reino fungi. Los hongos son un grupo monofilético, también llamado *Eumycota*⁽⁴⁶⁾. Los hongos están entre los organismos más importantes del mundo, no solo por su rol vital en las funciones del ecosistema sino también por su influencia en los humanos y en sus actividades relacionadas. Los hongos son esenciales para actividades cruciales tales como la descomposición, el ciclo de nutrientes, el transporte de nutrientes y son indispensables para lograr el desarrollo sostenible⁽⁴⁷⁾. Los hongos son un grupo diverso de organismos eucarióticos que incluyen levaduras, mohos y setas. Como saprófitos, su principal fuente de alimentos es la materia orgánica muerta y en descomposición. Los hongos son los “eliminadores de basura” de la naturaleza. Por la secreción de enzimas digestivas sobre las plantas muertas y la materia animal, ellos descomponen este material hasta nutrientes absorbibles para ellos mismos y para otros organismos vivos; así, ellos son los “recicladores” originales⁽⁴⁸⁾. Para propósitos prácticos, los hongos pueden ser divididos en 2 grupos: los hongos macroscópicos (setas, bejines y hongos tipo agalla) y los hongos microscópicos (mohos y levaduras). Las células de los hongos microscópicos existen en dos tipos morfológicos básicos: levaduras e hifas⁽⁴⁹⁾.

Los hongos se encuentran en casi todas partes en la tierra; algunos (los hongos saprofitos) viven sobre la materia orgánica en el agua y el suelo, y otros (los hongos parásitos) viven sobre y dentro de los animales y las plantas. Algunos son dañinos, mientras que otros son benéficos. Los hongos también viven en muchos materiales inverosímiles, causando el deterioro de cuero y plásticos y deterioro de mermeladas, encurtidos, y muchos otros alimentos. Los hongos benéficos son importantes en la producción de quesos, cerveza, vino, pan, y otros alimentos; así como de ciertas drogas (ej. la droga inmunosupresora ciclosporina) y antibióticos (ej. la penicilina)⁽⁴⁸⁾. En el transcurso del tiempo, más de 100,000 especies de hongos han sido reconocidos y descritos. Sin embargo, menos de 500 de estas especies han sido asociadas con enfermedades humanas, y no más de 100 son capaces de causar infección en individuos normales. El resto sólo son capaces de producir enfermedad en huéspedes que están debilitados o inmunodeprimidos⁽⁵⁰⁾.

2.1.2. Micosis

Las micosis de acuerdo a su ubicación, se clasifican en superficiales, cutáneas, subcutáneas, profundas y sistémicas.

2.1.2.1. Micosis Superficiales y Cutáneas

Estas micosis incluyen infecciones muy frecuentes que afectan al estrato córneo de la piel, la epidermis y a los anexos cutáneos: pelo y uñas ^(51 y 52). La pitiriasis versicolor es la micosis superficial más frecuente, cuyo agente etiológico es *Malassezia* spp. ^(53 y 54); otras enfermedades a este nivel son la piedra negra y piedra blanca, producidas por el ascomiceto *Piedraia hortae* y especies del género *Trichosporon* respectivamente ^(55 y 56).

Dentro de las micosis cutáneas hay que diferenciar dos términos; **dermatomycosis**, que se refiere a cualquier proceso micótico de la piel y dermatofitosis al causado por hongos dermatofitos ⁽⁵¹⁾. Los dermatofitos son un grupo de hongos queratinofílicos, taxonómicamente relacionados. La infección puede estar limitada a la capa córnea o llegar a estratos más profundos, sin invasión linfática. Estas micosis cutáneas se encuentran entre las infecciones de mayor prevalencia en el mundo y, dado que producen lesiones fácilmente observables, su presencia en el ser humano está documentada a lo largo de la historia ^(57 y 58). Los agentes etiológicos se clasifican en tres géneros diferentes: *Microsporum*, *Trichophyton* y *Epidermophyton*. La descripción de los géneros se basa en la morfología de las conidias y organelos accesorios ^(59 y 60).

Los hongos dermatofitos pueden clasificarse en especies antropófilas, zoofílicas y geofílicas, según cual sea su hábitat preferente ^(51 y 52). En la zona del Cuzco en Perú se ha reportado *Microsporum canis* y *Trichophyton mentagrophytes*, como los dermatofitos más frecuentes ⁽⁶¹⁾.

Candidiasis cutánea

Las infecciones por especies del género *Candida* y especialmente por *Candida albicans*, han aumentado en las últimas 3 décadas. La zona más frecuentemente afectada son los pliegues cutáneos donde la humedad crea un hábitat adecuado para su supervivencia. Se puede manifestar como: intertrigo de grandes pliegues, erosión interdigital, candidiasis del pañal, foliculitis, onicomycosis candidiásica con parinoquia y perionixis ⁽⁶²⁾.

Infección en las mucosas por *Candida spp.*

Entre ellas tenemos: infección oral o muguet, esofagitis, candidiasis de mucosa gastrointestinal no esofágica, vulvovaginitis y balanitis ^(63 y 64).

La especie causal más frecuente es *C. albicans*, pero en los pacientes tratados con fluconazol puede aislarse *C. glabrata* y *C. krusei*, especies menos sensibles o resistentes a este antifúngico ⁽⁶⁵⁻⁶⁷⁾.

2.1.2.2. Micosis Subcutáneas

Están causadas por hongos ambientales inoculados directamente en el tejido celular subcutáneo mediante un traumatismo. Presentan una agresividad local variable. Característicamente no se diseminan a distancia. Entre ellas se incluyen la cromoblastomicosis, esporotricosis, micetomas y una serie de cuadros raros: rinosporidiosis, entomofthoromicosis y lobomicosis ⁽⁶⁸⁻⁷⁰⁾. La esporotricosis es endémica en el Perú, en especial en la zona de Abancay ⁽⁷¹⁻⁷³⁾.

2.1.2.3. Micosis Profundas

Bajo la denominación de micosis profundas se incluyen las siguientes infecciones fúngicas: blastomicosis, coccidioidomicosis, histoplasmosis, paracoccidioidomicosis y criptococosis. Las cuatro primeras están producidas por otras tantas especies de hongos dimórficos térmicos, con crecimiento filamentosos a temperatura ambiente y en su estado saprofito, en el suelo, y en forma levaduriforme al parasitar al ser humano o en cultivo a 37 °C, con CO₂, en medio rico en aminoácidos. Las especies productoras son, respectivamente: *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum* y *Paracoccidioides brasiliensis*. Son especies con una distribución restringida a zonas geográficas muy concretas ⁽⁶⁸⁾. Tanto *Histoplasma capsulatum* y *Paracoccidioides brasiliensis* son endémicas en algunas zonas del Perú.

2.1.2.4. Micosis Sistémicas

Este término se reserva para aquellas micosis invasoras, o que afecten a dos o más órganos no adyacentes, producidas por especies fúngicas patógenas oportunistas. En su

etiología están implicadas especies ubicuas, de distribución mundial, que forman parte de la microflora ambiental o son comensales de la piel o mucosas. Habitualmente son eliminadas por los leucocitos polimorfonucleares y macrófagos, pero cuando hay una alteración de la inmunorespuesta del huésped, se ha producido un vacío ecológico por la administración de antibióticos o han tenido lugar circunstancias especiales que afectan a la función del sistema inmune, puede desarrollarse el cuadro clínico que, dadas las características del huésped, suele ser muy grave. El agente etiológico puede ser cualquier especie fúngica capaz de crecer a 37 °C y cuyos requerimientos nutricionales estén contemplados en los tejidos del huésped: levaduras, hongos miceliares moniliales o dematiáceos, ascomicetos, basidiomicetos y zigomicetos. Siendo los más frecuentes *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., *Blastoschizomyces capitatus*, *Trichosporon asahi*, *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp., *Mucor* spp., *Rhizopus* spp., así como otros géneros de las familias *Moniliaceae* y *Dematiaceae* ⁽⁷⁴⁻⁷⁶⁾.

En la tabla 1 se observan las principales características de las infecciones fúngicas a nivel mundial (77)

Tabla 1. Características de las principales infecciones fúngicas a nivel mundial

Localización corporal	Tipo de patógeno	Organo	Géneros mas frecuentes	Incidencia estimada de la infección*
Superficial	primaria	Piel y pelo	<i>Malassezia</i>	~ 140'000,000 casos/año
Cutánea	primaria	Piel y uñas	<i>Trichophyton</i> <i>Epidermophyton</i> <i>Microsporum</i>	~ 1500'000,000 casos/año
Mucosa	oportunista	Vagina, boca,	<i>Candida</i>	~ 75'000,000 casos/año ~ 9'000,000 casos/año
		Tracto digestivo, tracto urinario		
sistémico	oportunista	ojo	<i>Aspergillus</i> , <i>Fusarium</i>	~ 1'000,000 casos/año
			<i>Candida</i>	~ 300,000 casos/año
			<i>Aspergillus</i>	~ 350,000 casos/año
		cualquier órgano (pulmones, cerebro, sangre, etc.)	<i>Cryptococcus</i>	~ 1'000,000 casos/año
			<i>Histoplasma</i>	~ 500,000 casos/año
			<i>Pneumocystis</i>	> 200,000 casos/año
			<i>Coccidiomyces</i> , etc.	hasta 300,000 casos/año

Modificado de Vandeputte P. y col. ⁽⁷⁷⁾

2.1.3. Plantas Medicinales

Desde los tiempos más remotos, todas las sociedades han recurrido a las plantas como fuente de medicamentos. Actualmente, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el 80% de la población mundial recurre a la medicina tradicional para atender sus necesidades primarias de asistencia médica. La terapéutica tradicional se basa sobre todo en el empleo de extractos o principios activos de las plantas ⁽⁷⁸⁾.

Tanto la Biblia como la historia evolutiva de nuestro planeta, sitúan la aparición de las especies vegetales con gran anterioridad a la aparición en el mismo de los seres del reino animal. Son y han sido, por tanto, condición indispensable para la vida de multitud de especies animales y por supuesto del hombre.

Las especies vegetales han constituido, además de alimento, el primer remedio a los problemas de salud inherentes a la condición humana. El hombre antiguo, utilizando su propio instinto, observando a los animales y a través del conocimiento empírico que se sustenta en el cotejo de aciertos y errores, aprendió a distinguir las especies vegetales dañinas de las que podían serle de utilidad. El empleo terapéutico de las especies vegetales fue la base principal de la medicina de la Grecia clásica y la medicina árabe. Y, a pesar del gran oscurantismo de la Edad Media, se retoma su estudio con carácter científico en el Renacimiento (S. XV y XVI) y ve notablemente ampliada su farmacopea con las especies vegetales procedentes de las Indias Orientales y Occidentales tras el descubrimiento de América ⁽⁷⁹⁾.

Desde la eclosión de los fármacos de síntesis que forma la base de la terapéutica oficial de los países occidentales, las plantas de uso medicinal han seguido teniendo, no obstante, un lugar principal en el desarrollo de la farmacología. Se calcula que existen en el mundo más de 250 mil especies vegetales; de entre ellas se consideran como potencialmente medicinales unas 12 mil especies, pero debe tenerse en cuenta que solo se tiene conocimiento científico de un 10% del total de las especies ⁽⁸⁰⁾.

Las plantas medicinales fueron durante mucho tiempo nuestra principal fuente de productos terapéuticos. Con la aparición de la industria farmacéutica y los avances de farmacología, las plantas pasaron a ser fuente de principios activos de medicamentos de síntesis, y más tarde, han sido desplazadas por éstos. Ahora hay una “vuelta a la naturaleza” con el consiguiente aumento de consumo de productos a base de plantas medicinales ⁽⁸¹⁾.

Tenemos que diferenciar planta medicinal de droga vegetal. La OMS lo definió en 1978: planta medicinal es aquella que en uno o más órganos contiene sustancias que pueden ser utilizadas con finalidad terapéutica o son precursoras de fármacos de síntesis y droga vegetal es la parte de la planta medicinal en la que encontramos mayor concentración de principios activos, puede ser la hoja, la flor, la raíz, etc. ⁽⁸²⁾.

En el Perú la riqueza de las plantas medicinales es muy amplia y está enmarcada dentro de más de 4400 especies de usos conocidos por las poblaciones locales, de las cuales un gran porcentaje se presenta en la región andina ⁽⁸³⁾ y de la selva.

Actualmente las plantas medicinales siguen siendo usadas por un gran porcentaje de la población mundial, para diversas enfermedades, por ejemplo tenemos:

Plantas con actividad antioxidante; Škrovánková S. et al. (2012), realizaron una revisión de las mismas, que pertenecen a diferentes familias, especialmente Lamiaceae (romero, salvia, orégano, mejorana, albahaca, tomillo, menta, melisa), Apiaceae (comino, hinojo, alcaravea), y Zingiberaceae (cúrcuma, jengibre). Además el efecto antioxidante está relacionado a sustancias como los compuestos fenólicos ⁽⁸⁴⁾.

Las plantas medicinales también tienen propiedades antiinflamatorias y se usan para tratar enfermedades crónicas, incluyendo artritis reumatoidea y enfermedad inflamatoria de Bowel; entre los compuestos derivados de plantas con propiedades antiinflamatorias, se puede mencionar a polifenoles del té verde, curcumina, resveratrol, ácido boswélico, y cucurbitacinas ⁽⁸⁵⁾.

Plantas con potencial antifertilidad han sido estudiadas, entre ellas 122 familias de plantas; de las cuales 49.2% pertenecen a la familia Fabaceae, 40.98% a Asteraceae, 19.7% a Euphorbiaceae, 16.4% a Apiaceae, 12.3% a Poaceae, 11.5% a Labiateae ⁽⁸⁶⁾.

Las plantas medicinales también se usan en enfermedades mentales, así tenemos a salvia, Ginkgo biloba, y mezclas complejas de otros remedios tradicionales. La melisa y la lavanda alivian la agitación en personas con demencia y la hierba de San Juan trata la depresión. El valor potencial de numerosos extractos de plantas o químicos (curcumina) con actividad neuroprotectiva todavía debe revisarse ⁽⁸⁷⁾.

Hay evidencia científica de uso de *Hypericum perforatum* para la depresión mayor, y de *Piper methysticum* para desordenes de ansiedad. Varios ensayos clínicos preliminares proveen evidencia positiva de efectos antidepresivos de *Echium amoenum*, *Crocus sativus*,

y *Rhodiola rosea*; y de actividad ansiolítica de *Matricaria recutita*, *Ginkgo biloba*, *Passiflora incanata*, *Echium amoenum*, y *Scutellaria lateriflora* ⁽⁸⁸⁾.

Las plantas medicinales también tienen tradición como anticancerígenos, entre las plantas que poseen estas propiedades podemos mencionar a *Allium sativum*, *Aloe vera*, *Solanum Lycopersicum*, *Azadirachta indica*, *Piper nigrum*, *Piper longum*, *Terminalia arjuna*; además se puede mencionar a los compuestos anticancerígenos derivados de plantas como: camptoteticina, las epipodofilotoxinas, los alcaloides y los taxanos ⁽⁸⁹⁾.

La literatura también reporta el potencial de las plantas como inmunoestimulantes, como ejemplos tenemos: *Allium sativum*, *Asparagus racemosus*, *Clerodendrum phlonidis*, *Curcuma longa*, *Emblica officinalis*, *Mangifera indica*, *Piper longum*, *Salicornia herbacea* ⁽⁹⁰⁾, *Uncaria tomentosa* ⁽⁹¹⁾.

Muchas otras actividades de plantas medicinales han sido reportadas como antimaláricos ⁽⁹²⁾, antimicrobianos ⁽⁹³⁻⁹⁶⁾, anti-obsesidad ⁽⁹⁷⁾, etc.

2.2. Bases Teóricas

2.2.1. Plantas Medicinales con actividad antifúngica

Las plantas producen muchos metabolitos secundarios, como las fitoanticipinas y las fitoalexinas, que utilizan para defenderse de la infección por agentes fitopatógenos, entre ellos los hongos ^(98 y 99). La medicina tradicional ha hecho uso de muchos diferentes extractos de plantas para el tratamiento de infecciones fúngicas y muchas de ellas han sido evaluadas por su acción *in vitro* ⁽¹⁰⁰⁾. Basado en el conocimiento de que las plantas desarrollan sus propias defensas contra patógenos fúngicos ellos parecen ser una interesante fuente para compuestos antifúngicos.

La literatura reporta que 284 compuestos distribuidos en 11 tipos tienen actividad fungicida. De estos tipos de compuestos químicos, tres son los citados más regularmente: los compuestos fenólicos (47%), los terpenoides (29%), y los alcaloides (11%). 123 compuestos fenólicos, 80 terpenoides, y 30 alcaloides con actividad fungicida son mencionados en la literatura. 1064 especies de plantas, distribuidas en 150 familias, tienen actividad antifúngica. Las familias más frecuentemente citadas son la Lamiaceae y la Fabaceae, representando un 19% y 18% respectivamente. Dentro de Lamiaceae, 196 especies con actividad fungicida están distribuidas en 48 géneros, entre ellos: *Teucrium*,

Pycnanthemum, *Thymus*, *Satureja*, *Origanum*, *Micromeria*, *Mentha*, *Monarda*, y *Ocimum*. Similarmente ocurre en la familia Fabaceae, 190 especies tienen actividad fungicida distribuidos en 94 géneros. Entre ellos, 8 son los más citados: *Genista*, *Rhynchosia*, *Canavalia*, *Trifolium*, *Acacia*, *Chamaecytisus*, *Cytisus*, y *Vigna* ⁽¹⁰¹⁾.

La distribución de los compuestos antifúngicos puede ser definida ya sea en base a su distribución taxonómica o en base a su clase química. Los antifúngicos naturales pertenecen a todas las clases mayores de metabolitos secundarios como compuestos fenólicos, alcaloides, terpenoides, saponinas, flavonoides, proteínas, y péptidos, etc. ⁽¹⁰²⁾.

A la fecha se han realizado numerosos estudios para evaluar la actividad antifúngica de plantas, podemos citar algunos ejemplos hechos en Brasil y México:

Braga et al. (2007) estudiaron 20 plantas usadas en la medicina tradicional brasileña por su actividad antifúngica contra *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans*. Entre los 20 extractos metanólicos ensayados, los extractos del *Schinus terebintifolius*, *Occimum gratissimum*, *Cajanus cajan*, y *Piper aduncum* fueron los más activos contra *C. albicans* (CMI de 1.25 mg/mL) mientras que *Bixa orellana*, *O. gratissimum*, y *Syzygium cumini* mostraron la mejor actividad contra *C. neoformans* (CMI de 0.078 mg/ml) ⁽¹⁰³⁾.

Alanís-Garza et al. (2007), estudiaron la actividad antifúngica *in vitro* de plantas del nor-este de México contra algunos de los principales agentes etiológicos inductores de micosis pulmonar, *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Histoplasma capsulatum*, y *Coccidioides immitis*. Diez extractos hidroalcohólicos de las 15 plantas evaluadas mostraron actividad antifúngica contra al menos uno de estos hongos. Además, se llevó a cabo la extracción diferencial con disolventes de diferentes polaridades, y 16 extractos mostraron actividad en un rango de 16 a 125 µg/mL contra diferentes hongos ⁽¹⁰⁴⁾.

Por otro lado, sabiendo que las biopelículas de *Candida*, representan un problema adicional, también hay estudios que evalúan la actividad de varias plantas contra las biopelículas de *Candida*, Sardi JC. et al. (2013) hacen una recopilación de ellas, entre las que se pueden mencionar a extractos de *Allium sativum*, *Cassia spectabilis*; frutos de *Caesalpinia ferrea*; aceites esenciales de *Croton cajucara* Benth ricos en linalol, *Ocimum americanum* L., y *Cinnamomum zeylanicum* ⁽¹⁰⁵⁾.

En la actualidad se dispone de variados agentes antimicóticos obtenidos de plantas que se han probado tanto *in vitro* como *in vivo* con buenos resultados ⁽¹⁰⁶⁾. De la destilación

de las hojas de la planta *Melaleuca alternifolia* se obtiene el aceite esencial del árbol del té, un fitofármaco que ha mostrado actividad antifúngica por la acción directa de los componentes activos, terpinen-4-ol y 1,8-cineol, a una concentración que varía del 29% al 45% y del 4,5% al 16,5%, respectivamente, contra las estructuras celulares. El aceite se usa para el tratamiento de infecciones dérmicas por hongos de los géneros *Candida* y *Malassezia*, y en las onicomicosis por dermatofitos ⁽¹⁰⁷⁾.

En los extractos alcohólicos, los aceites esenciales de los bulbos del ajo (*Allium sativum*), se han aislado compuestos de naturaleza sulfúrica, alicina y ajoeno, a los que se les atribuye el efecto antifúngico sobre especies de los géneros *Candida*, *Malassezia*, *Cryptococcus* y *Aspergillus*, así como contra especies de dermatofitos y el hongo *Paracoccidioides brasiliensis* ⁽¹⁰⁸⁾.

De la planta del eucalipto (*Eucalyptos globulus*) se obtiene aceites esenciales, extractos e infusiones con actividad antifúngica, a concentraciones entre el 54% y el 95% del componente activo 1,8-cineol ⁽¹⁰⁹⁾.

Las plantas *Thymus vulgaris* y *Thymis zygis* son fuente de las moléculas timol y carvacrol, las cuales tienen actividad principalmente contra *Cryptococcus neoformans* y especies de *Candida*, *Aspergillus*, *Saprolegnia* y *Zygorhynchus* ^(110 y 111).

Otras moléculas producidas por las plantas son las fitodefensinas, de naturaleza peptídica y ricas en cisteína, con capacidad de inhibir el crecimiento de los hongos al producir en ellos cambios morfológicos y daño en algunas de sus estructuras celulares ⁽¹¹²⁾. En las semillas de la planta del maíz (*Zea mays*) se encuentra la proteína zeamatina, que tiene como función proteger a la planta de hongos patógenos por la capacidad de producir lisis osmótica, en estudios realizados contra *Candida albicans*, la molécula tiene una CMI de 0,5 mg/L ⁽¹¹³⁾.

2.2.2. Determinación de la actividad antifúngica

Los estudios de susceptibilidad a antifúngicos antiguamente no eran métodos estandarizados, eran inconsistentes y muy poco reproducibles, ya que hay muchos factores que influyen en estos ensayos, como el tamaño del inóculo, la composición y pH del medio, formato de la prueba y temperatura de incubación ^(114 y 115). El National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), actualmente Clinical of Laboratory Standards

Institute (CLSI) de Estados Unidos, en el año 1992 publicó el primer borrador de un estándar para la susceptibilidad de levaduras, que se basaba en técnicas de macrodilución y que luego se adaptó al formato de microdilución. Fue aprobado en 1997 para medir las Concentraciones Mínimas Inhibitorias de las principales especies de levaduras oportunistas, demostrando una adecuada reproducibilidad interlaboratorio en diversos estudios multicéntricos ⁽¹¹⁴⁻¹¹⁶⁾. En Europa manejan estándares similares para evaluar la susceptibilidad antifúngica de levaduras, dadas por el Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) del European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), documento EDef 7.1 y Edef 7.2 ^(117 y 118).

Para hongos filamentosos los estándares son más difíciles de establecer, actualmente se usan como referencia los documentos CLSI M38-A2 y su contraparte europea ^(119 y 120). Recién en el documento M38-A2, se dan pautas para el trabajo con dermatofitos ⁽¹¹⁹⁾. Estos últimos años se ha logrado establecer también parámetros para la utilización de técnicas de disco difusión para la susceptibilidad antifúngica, concretamente el documento CLSI M44-A2 ⁽¹²¹⁾.

Para evaluar la susceptibilidad antifúngica también existen otros métodos que tienen buena correlación con los métodos de referencia del CLSI y el EUCAST, entre ellos tenemos al E-test[®], aprobado por la FDA para la susceptibilidad *in vitro* de *Candida sp* contra fluconazol e itraconazol ⁽¹²²⁻¹²⁵⁾. El e-test es un método sencillo que involucra la inoculación del hongo en la superficie del agar, seguido de la colocación de una tira impregnada con un gradiente de concentración de antifúngico, lo cual permite determinar la CMI. Es un método particularmente eficaz en la detección de resistencia a anfotericina B en *Candida* ⁽¹²²⁾. Otros métodos comerciales utilizados se basan en el método de microdilución del CLSI, como el Sensitre[®] Yeast One, pero con la diferencia que para facilitar la lectura usa un sustrato cromogénico, se ha usado con éxito en levaduras ⁽¹²⁶⁾ y también con hongos filamentosos ⁽¹²⁷⁾. Otro sistema disponible en el mercado es el sistema Vitek 2[®] (Biomérieux), que utiliza una lectura espectrofotométrica, este sistema además tiene la ventaja de identificar levaduras ⁽¹²⁸⁾.

Otros métodos disponibles para medir la susceptibilidad antifúngica son la determinación de concentración fungicida mínima, determinación de curvas de muerte, citometría de flujo y cuantificación de ergosterol, los cuales, debido a su mayor

complejidad, se realizan en laboratorios de referencia o altamente especializados en el tema ^(115 y 122). Por último otro método útil pero todavía no estandarizado es el de dilución en agar, que tiene buena correlación con los métodos de referencia ⁽¹²²⁾.

2.3. Marco Conceptual

Plantas Medicinales en Estudio

A continuación describimos las plantas medicinales utilizadas en la tesis.

2.3.1. *Hypericum laricifolium* (CHINCHANGO)

Clasificación Taxonómica

SUPERDIVISION	:	SPERMATOPHYTA
DIVISION	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	MAGNOLIOPSIDA
SUB-CLASE	:	DILLENIDAE
ORDEN	:	THEALES
FAMILIA	:	HYPERICACEAE
GENERO	:	<i>Hypericum</i>
ESPECIE	:	<i>Hypericum laricifolium</i>

La especie pertenece a la familia Hypericaceae. Esta familia comprende 1350 especies en 47 géneros, encontrados principalmente en regiones tropicales pero también en regiones templadas del norte. La familia Hypericaceae, en ocasiones es incluida en la familia Clusiaceae subfamilia Hypericoideae ⁽¹²⁹⁾.

El género *Hypericum* consta de 400 especies, tiene una distribución cosmopolita, pero es más diverso en las regiones templadas y en las montañas tropicales ^(130 y 131). Para el Perú se citan 14 especies, de las que 6 son consideradas endémicas ⁽¹³²⁾. Etimológicamente el nombre *Hypericum* viene de las palabras griegas *hyper* (sobre) y *eikon* (imagen) ⁽¹³³⁾.

Sinónimos: *Brathys acerosa* (Kunth) Spach; *Hypericum acerosum* Kunth; *Hypericum laricifolium* var. *acerosum* (Kunth) Wedd.; *Hypericum laricoides* Gleason; *Hypericum platypetalum* Turcz.; *Hypericum racemulosum* Turczadhaerescens ⁽¹³⁴⁾.

Nombres Comunes: Chinchango, chinchanga, chinchahual, romerillo, matequillcana.

Descripción: Arbustos, árboles pequeños, sufrútices o hierbas, glabros o con pelos simples; tallo con corteza exfoliante; leño fisurado. Glándulas conteniendo hipericina (oscuras) o aceites esenciales (pálidas) presentes en varias partes de la planta. Hojas opuestas, decusadas, sésiles o cortamente pecioladas, más o menos unidas en la base; lámina entera, glándulas presentes. Inflorescencia de una sola flor o numerosas flores. Flores perfectas, amarillas, brillantes, homostilas; sépalos 5, libres, persistentes, con glándulas lineares o puntiformes; pétalos 5, con glándulas lineares o puntiformes; estambres en 5 fascículos no diferenciados formando un anillo continuo de 5–250 estambres, filamentos muy cortos, anteras amarillas o anaranjadas, brillantes; ovario súpero, 3–5 lóculos, numerosos óvulos en placentas parietales; estilos 3–5, libres, estigmas capitados. Cápsula con 3–5 valvas ⁽¹³⁰⁾.

Distribución geográfica: En el Perú, lo encontramos en los departamentos de Amazonas, Ancash, Cajamarca, Huánuco, La Libertad, Pasco, Piura, y San Martín; entre los 2 000 y 4 500 msnm ⁽¹³⁴⁾. También esta especie la encontramos en Venezuela, Colombia ⁽¹³⁵⁾, y Ecuador ⁽¹³⁰⁾ entre los 2 200 a 4 300 msnm.

Composición química: se señala que de las partes aéreas de *Hypericum laricifolium* H.B.K. se aislaron dos nuevos productos naturales: hentriacontanil cafeato y nonaonasil cafeato; y también se reporta la presencia de los siguientes compuestos: estigmasterol, β -sitosterol, ácido 3 epi-betulínico, ácido p-hidroxibenzóico, ácido 3,4-dimetoxibenzoico, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido shikímico, doconasol, quercetina, quercetin 3-O-galactósido, quercetin 3-O-rutósido, quercetin 3-O-ramnósido ⁽¹³¹⁾. También encontramos en la planta entera azúcares, gomas, taninos, glicósidos saponínicos, esteroides, triterpenoides, flavonoides, carotenoides y resinas; y en las flores la hipericina ⁽¹³⁶⁾.

Usos de la especie: En la zona de recolección se usa para los “nervios”. Los pobladores de la zona de Cajamarca (San Miguel), lo usan como materia colorante, para teñir de amarillo el algodón, la lana y para curar una verruga tipo “zute” ⁽¹³⁷⁾. El chinchango se usa también como cicatrizante ⁽¹³⁸⁾ y en Piura (Huaylingas, Morropón) se usa para curar el Paludismo ⁽¹³⁹⁾.

2.3.2. *Ilex guayusa* Loes “GUAYUSA”

Clasificación taxonómica

SUPERDIVISION	:	SPERMATOPHYTA
DIVISION	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	EQUISETOPSIDA
SUB-CLASE	:	MAGNOLIIDAE
ORDEN	:	AQUIFOLIALES
FAMILIA	:	AQUIFOLIACEAE
GENERO	:	<i>Ilex</i>
ESPECIE	:	<i>Ilex guayusa</i> Loes

La especie pertenece a la familia aquifoliaceae, una familia perteneciente al orden Aquifoliales. Contiene sólo dos géneros de árboles y arbustos perennifolios o caducifolios, ordinariamente dioicos. Presenta el género *Ilex* y el *Nemopanthus* ⁽¹⁴⁰⁾.

El género *Ilex* tiene 405 especies ⁽¹⁴¹⁾, de las cuales unas 300 son propias de países templados y tropicales, sobretodo de América. Se caracterizan por tener hojas simples y alternas con flores generalmente unisexuales, actinomorfas, inconspicuas, a menudo tetrámeras, de ovario súpero y dispuestas frecuentemente en cimas. Los frutos son drupas ⁽¹⁴²⁾. Algunas especies de este género son *Ilex brasiliensis*, *Ilex paraguariensis*, *Ilex integra* e *Ilex guayusa* Loes.

Nombres comunes: Guayusa, Huayusa (Colombia, Ecuador, Perú); Wuayus (Shuar, Ecuador) ⁽¹¹⁾.

Descripción: Árbol de gran tamaño y muy ramificado cuyo tronco llega a medir hasta 1 m de diámetro. Sus hojas miden hasta 15 cm. de longitud por 7 cm de ancho y son coriáceas, dentadas, glabras, enteras, elípticas. Flores con peciolos cortos (hasta 1 cm de largo). Cáliz persistente, hasta 5 lóbulos y una corola de pétalos obtusos y con un fruto globuloso y presenta de 4 a 6 celdillas ⁽¹⁴³⁾.

Distribución geográfica: En el Perú la planta se encuentra en los departamentos de Amazonas, Cajamarca, La Libertad, Lambayeque, Loreto, Madre de Dios, Puno y Cerro de Pasco. En sudamérica lo encontramos además en Colombia, Ecuador, y Brasil ⁽¹⁴⁴⁾.

Composición química: la cafeína es el mayor constituyente del género *Ilex*; triterpenos y derivados del ácido chlorogénico también han sido aislados. También se reporta la presencia de piridoxina, riboflavina, ácido nicotínico, ácido ascórbico, colina y ácido isobutírico ⁽¹¹⁾.

Usos de la especie: En el lugar de recolección; las hojas hervidas o infusión dan el té de guayusa, que se toma como bebida caliente o como sustituto del café, se toma solo o acompañado de los alimentos. Es estimulante del sistema nervioso, si se consume muy concentrado produce insomnio. El cocimiento concentrado de las hojas endulzado con miel de abeja se da de beber a las mujeres que se cree que son infértiles para que se vean embarazadas, toman durante las noches después de 3 días que se ha retirado la regla, por un periodo de 11 noches consecutivas. La infusión de las hojas y cañazo se toma para los resfríos comunes.

2.3.3. *Juglans neotropica* Diels “NOGAL”

Clasificación Taxonómica

SUPERDIVISION	:	SPERMATOPHYTA
DIVISION	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	MAGNOLIOPSIDA
SUB-CLASE	:	HAMAMELIDAE
ORDEN	:	JUGLANDALES
FAMILIA	:	JUGLANDACEAE
GENERO	:	<i>Juglans</i>
ESPECIE	:	<i>Juglans neotropica</i> Diels

La especie pertenece a la familia Juglandaceae; pequeña familia de árboles y arbustos caducifolios, monoicos. Comprende 7-8 géneros y alrededor de 60 especies originarias de las regiones subtropicales y templadas de América del Sur y del Norte, Asia y Europa ⁽¹²⁹⁾.

El género *Juglans*; comprende 15 especies nativas del Sureste de Europa, Asia y América del Norte y del Sur. Algunas especies de este género son: *Juglans regia* L., *Juglans nigra* L., *Juglans cinerea* L., *Juglans ailanthifolia* Carrière ⁽¹²⁹⁾, y *Juglans neotropica* Diels (nogal Peruano).

Nombres comunes: Nogal, tocte, cedro negro, cedro nogal, nogal bogotano.

Descripción: En condiciones favorables normalmente alcanza unos 20 m de altura. Es usual que la mitad del fuste sea limpio. De porte recto. Su copa es irregular, con tendencia a ser proporcionadamente reducida. De ramas gruesas. Las flores masculinas aparecen en las ramas del año anterior, en las axilas de las cicatrices foliares. Son numerosas y dispuestas en espiga. Las flores femeninas se ubican, en grupos de 2 a 4, en el extremo de las ramas. Frutos de drupa redonda, de color pardo a negro, con pedúnculo corto. Al disgregarse el mesocarpio del fruto, queda la nuez o semilla con su cubierta característica ⁽⁹⁾.

Distribución geográfica: En el Perú su distribución se observa entre 1 000 y 3 000 msnm. Lo encontramos en los departamentos de Amazonas, Cuzco, Huánuco, Junín, Lima, Loreto, San Martín y Ucayali ^(13 y 145).

Composición química: La corteza contiene un tanino elágico. La pulpa del fruto es rica en ácido málico y oxálico, además contiene una naftaquinona: la juglona. Las hojas tienen un aceite esencial y alcaloide: la juglandina, juglona y polifenol. La almendra de la semilla del nogal, contiene entre 60% y 65% de aceites ⁽⁹⁾.

Usos de la especie: En el Perú la infusión de hojas de nogal (por su poder astringente) se usa para cortar diarreas, lavar heridas, contra la tos y para teñir de negro el cabello. También debido a dicha propiedad, el jugo de los frutos tiernos mezclado con miel de abeja es usado como cicatrizante en el tratamiento de heridas y llagas ⁽⁹⁾.

La semilla (nuez) constituye un importante alimento humano. Debido a su contenido en tanino, tanto la corteza como las hojas, el mesocarpio de los frutos y aún las raíces, se utilizan para teñir (color nogal, es decir, marrón oscuro) tejidos de algodón y lana. En Colombia la infusión de las hojas se toma como depurativo de la sangre y la infusión de las raíces se toma para tratar afecciones del hígado ⁽⁹⁾.

2.3.4. *Piper spp.* “MATICO”

Clasificación Taxonómica

SUPERDIVISION	:	SPERMATOPHYTA
DIVISION	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	MAGNOLIOPSIDA
SUB-CLASE	:	ARCHICLAMIDEAS
ORDEN	:	PIPERALES
FAMILIA	:	PIPERACEAE
GENERO	:	<i>Piper</i>
ESPECIE	:	<i>Piper spp</i>

La especie pertenece a la familia de las Piperaceae, comprende especies leñosas y herbáceas de las regiones tropicales. Es una familia de 2 000 o más especies, donde la mayoría se agrupa en los géneros *Piper* y *Peperonia*, ambos ampliamente representados en el Perú ⁽⁹⁾.

Piper es un género de Piperaceae mayormente constituido por arbustos, y casi exclusivamente tropical. El género *Piper* comprende cerca de 700 especies, entre éstas, desde el punto de vista económico, son importantes aquellas de las que se obtiene la pimienta: *Piper nigrum* (pimienta negra), *P. officinarum*, *Piper longum*, *Piper cubeba*. En particular, la pimienta negra es el fruto completo, mientras que la pimienta blanca se obtiene al quitar el pericarpo. En el Perú el género *Piper* está representado por 210 especies, 2 subespecies, y 33 variedades ⁽¹⁴⁶⁾.

Descripción: En el Perú no existen estudios relacionados con la descripción botánica de la especie en estudio, según la Dra. Graciela Vilcapoma la muestra se acerca bastante a la especie conocida como *Piper caucaense* Yunck; la especie mencionada se encuentra en el Perú en el departamento de Amazonas ⁽¹⁴⁷⁾. Esta planta por influencia de las condiciones ambientales, adopta formas típicas del lugar, por ello las hojas de la zona de recolección, son diferentes a las halladas en otras partes del país.

Distribución Geográfica: Esta planta es oriunda del departamento de Amazonas, entre los 1 500 – 2 000 msnm, en los bosques nublados. Por otro lado a continuación

mencionaremos la distribución una especie parecida a la estudiada, *Piper angustifolium* R&P, que se desarrolla entre 0- 3 000 msnm y lo encontramos en los departamentos de Amazonas, Piura, Lambayeque, Cajamarca, San Martín, Loreto, Huánuco, Ucayali, Cerro de Pasco, Lima, Junín, Cuzco, Madre de Dios, Ayacucho ⁽¹⁴⁸⁾.

Composición química: En el género *Piper* se han aislado los siguientes grupos de compuestos: alcaloides, amidas, propenilfenoles, lignanos, neolignanos, terpenos, esteroides, kawapironas, piperolidos, chalconas, hidrochalconas, flavonas, flavonones y otros compuestos (alcanos, alcoholes, ácidos, ésteres, y ciclohexanos oxigenados) ⁽¹⁴⁹⁾.

Usos de la especie: La especie *Piper angustifolium* R&P; en la era preincaica, se usó como hemostático (ramas) y antiinflamatorio (hojas) ⁽¹⁵⁰⁾. En Huarica, Cerro de Pasco, las hojas se usan para cicatrizar heridas externas ⁽¹⁴⁸⁾. Además el cocimiento de las hojas (10 g/L), se aplica en la parte afectada, y también se usa para afecciones urinarias ⁽¹⁵⁰⁾.

2.3.5. *Piper lineatum* “LUTO”

Clasificación Taxonómica

SUPERDIVISION	:	SPERMATOPHYTA
DIVISION	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	MAGNOLIOPSIDA
SUB-CLASE	:	ARCHICLAMIDEAS
ORDEN	:	PIPERALES
FAMILIA	:	PIPERACEAE
GENERO	:	<i>Piper</i>
ESPECIE	:	<i>Piper lineatum</i>

Nombres comunes: Luto, matico, po'señempan.

Las características generales del género ya se explicaron anteriormente. La planta es un arbusto silvestre de 2 -3 metros de alto y que habita en bosque secundario en suelo arcilloso.

Distribución geográfica: La planta se encuentra en el Perú y el Ecuador. En el Perú lo podemos encontrar en los departamentos de Amazonas, Cajamarca, Huánuco, Junín, Loreto, Cerro de Pasco y San Martín ⁽¹⁵¹⁾.

Usos: La infusión de las hojas es desinflamante, cicatrizante de heridas externas y procesos de úlceras gástricas; para lavados vaginales en casos de inflamaciones por micosis; en casos de heridas y abscesos se hace hervir una porción de hojas y con el agua caliente que se pueda soportar las temperaturas se lava la zona afectada y se pone emplastos con las hojas. En caso de úlceras y malestar a las vías urinarias se toma el cocimiento de las hojas.

2.3.6. *Psidium guajava* “GUAYABA”

Clasificación Taxonómica:

SUPERDIVISION	:	SPERMATOPHYTA
DIVISION	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	MAGNOLIOPSIDA
SUB-CLASE	:	ROSIDAE
ORDEN	:	MYRTALES
FAMILIA	:	MYRTACEAE
GENERO	:	<i>Psidium</i>
ESPECIE	:	<i>Psidium guajava</i> L.

La especie pertenece a la familia Myrtaceae, familia muy extensa formada por gran número de plantas leñosas que van desde matas hasta grandes árboles. Familia compuesta por alrededor de 120 géneros con cerca de 3 000 especies originarias de zonas tropicales y subtropicales de Australia principalmente, Asia y América. La familia tiene gran importancia económica al encontrarse en ella plantas de gran interés y utilidad por sus frutos comestibles, obtención de especias, aceites, maderas, etc. Igualmente numerosas especies tienen gran importancia como plantas ornamentales. Algunos de los géneros son *Agonis*, *Angophora*, *Callistemon*, *Eucalyptus*, *Eugenia*, *Feijoa*, *Lophomyrtus*, *Luma*, *Melaleuca*, *Metrosideros*, *Myrciaria*, ***Psidium***, *Syncarpia*, *Syzygium*, *Tristania* ⁽¹²⁹⁾.

El género *Psidium* comprende; árboles y arbustos siempre verdes de hojas opuestas, simples, enteras. Flores solitarias o en cimas axilares o terminales paucifloras. Cáliz urceolado con el tubo prolongado por encima del ovario, con 4-5 lóbulos, persistente. Corola con 4-5 pétalos blancos; androceo con numerosos estambres dispuestos en varias series. Fruto en baya globosa o piriforme, a veces comestible. Comprende unas 100 especies nativas de América tropical ⁽¹²⁹⁾.

Nombres comunes: Guayaba, guayabo (Bolivia, Colombia, Ecuador, Perú, Venezuela); chuará-cacoto (Bolivia); goiaba, goiabeira, araca goiaba (Brasil); sahuinto (Perú: Quechua) ⁽¹¹⁾, guayabillo, kima (cocama), kimanski, llómy (amuesha), matos, sacha, sailla, guayavo, huayabo ⁽¹⁵⁰⁾.

Descripción: Arbol pequeño de hasta 5 m de altura; tallos ramificados; hojas opuestas, sencillas, coriáceas, enteras, ovaladas; flores blancas, pequeñas, dispuestas en las axilas de las hojas; el fruto es una baya comestible que toma un color amarillo cuando madura, de unos 5 cm de diámetro, globoso, liso, con una pulpa rosada y numerosas semillas ⁽¹¹⁾.

Distribución geográfica: En el Perú, crece en climas tropicales y subtropicales: San Martín, Loreto, Huánuco, Junín, Lima, Cuzco, ⁽¹⁵⁰⁾ y Amazonas.

Actualmente se extiende desde México y Centroamérica, hasta Sudamérica, específicamente en Brasil y **Perú**, en Las Antillas y el sur de Florida. Su área ecológica se encuentra en la franja paralela al Ecuador, con límites que no van más allá de los 30° de cada hemisferio. Siglos atrás fue llevada a África, Asia y la India y actualmente se le encuentra en más de 50 países con clima tropical. En Hawái, la guayaba crece en franjas desérticas con precipitaciones menores a 250 mm ⁽¹⁵²⁾.

Composición química: En general en el género *Psidium* se ha descrito la presencia de saponinas, sapogeninas, elagitaninos y triterpenos. Entre los compuestos químicos de la planta se reportan: vitamina C, aceites esenciales en las hojas (cariofileno, nerolidiol, bisaboleno, aromadendreno, p-selineno, α -pineno y 1,8-cineol), carbohidratos, taninos, flavonoides, triterpenoides, esteroides y alcaloides ^(153 y 154).

Usos de la especie: En el Perú; las hojas y la raíz se usan como astringentes, la decocción de la corteza para el dolor de estómago, el cocimiento de hojas para lavar las piernas y desinflamarlas, el cocimiento de frutos y hojas para disenterías y diarreas, además

las semillas, se muelen y se hace una pasta con agua que se aplica en barros y granos del rostro ^(11 y 150).

En otros países del mundo se usa en la medicina herbolaria para combatir diferentes enfermedades como febrífuga, antisecretoria, hemostático, antiséptico, astringente, antidisentérico, cicatrizante, para tratamiento de la diabetes, digestivo y anticatarral, para los cólicos, diarreas, inflamación gastrointestinal aguda y como diurético, entre otros usos ⁽¹⁵²⁻¹⁵⁵⁾.

2.3.7. *Senna reticulata* (Willdenow) H. Irwin & Barneby “RETAMA”

Clasificación taxonómica

SUPERDIVISION	:	SPERMATOPHYTA
DIVISION	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	MAGNOLIOPSIDA
SUB-CLASE	:	ROSIDAE
ORDEN	:	FABALES
FAMILIA	:	FABACEAE
GENERO	:	<i>Senna</i>
ESPECIE	:	<i>Senna reticulata</i>

La familia fabaceae está compuesta de 440 géneros, 12 000 especies. Los géneros más numerosos son: Astragalus (2 000), Indigofera (500), Crotalaria (500), Trifolium (300), Dalea (160), Phaseolus (200) y Lupinus (200) ⁽¹⁵⁶⁾.

El género *Senna* es pantropical con 260 especies, de las cuales 200 especies están en el continente americano ⁽¹⁵⁷⁾.

La especie *Senna reticulata*, tiene como sinónimo a *Cassia reticulata*.

Nombres comunes: Gayomba (España), giesta (Portugal, Brasil), ginesta (España), ginestera (España), **retama** (Perú, Uruguay), retama Amarilla (Uruguay), retama de olor (España), spanish broom (USA), weaver's broom (USA).

Descripción: Arbusto de hojas amplias, hasta 8 m de altura, de copa amplia. Hojas compuestas, imparipinnadas, alternas, con estípulas; con 7-13 pares de folíolos, ampliamente oblongos a ligeramente obovados y asimétricos, 7-19 cm de largo y 3-7 cm de ancho, ápice redondeado, base inequilátera y obtusa, haz opaca, envés pubérulo. Inflorescencias axilares o terminales en racimos largos, 15-60 cm de largo; sépalos oblongo-obovados, cóncavos, 10-14 mm de largo; pétalos amarillos, oblongo-obovados u obovado-flabelados. Fruto en legumbre, aplanado, 10-15 cm de largo. La planta por la noche cierra sus hojas ⁽¹⁵⁸⁾.

Distribución geográfica: Lo encontramos en toda América central y América del Sur, principalmente en Brasil, Colombia, Ecuador, Surinam, Venezuela y Perú. En el Perú se ha reportado su presencia en los departamentos de Amazonas, Loreto, Pasco, San Martín ⁽¹⁵⁹⁾, y Cajamarca.

Composición química: En *Senna reticulata* se han aislado: seis antraquinonas (fisciona; aloe-emodina; 1,3,8-triidroxiantraquinona; 1,6,8-triidroxi-3-metoxiantraquinona; y crisofanol), un flavonoide (campferol), una biantrona de crisofanol, dos esteroides (β -sitosterol; estigmasterol) y dos triterpenos (α -amirina; β -amirina) ⁽¹⁶⁰⁾.

Usos de la especie: En la zona de recolección se usa el cocimiento de las hojas y flores contra la fiebre amarilla y el cocimiento concentrado de hojas y frutos inmaduros, para la sarna y las manchas blancas de la piel. Con los tallos y hojas jóvenes trituradas se prepara un remedio para curar granos e infecciones de la piel ⁽¹⁶¹⁾. En Brasil se destacan los usos en enfermedades de la piel, como micosis, erupción cutánea, sarna, eccema y verruga. También es utilizada como purgante, diurético, antidiabético, laxante y abortivo, y para hipertensión, helmintiasis, espasmos, estreñimiento. Vale resaltar su uso como insecticida y repelente. Generalmente, dependiendo de las indicaciones de tratamiento, las partes utilizadas son las hojas, semillas y raíces ⁽¹⁶²⁾.

2.3.8. *Terminalia catappa* “CASTAÑILLA”

Clasificación Taxonómica

SUPERDIVISION	:	SPERMATOPHYTA
DIVISION	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	MAGNOLIOPSIDA
SUB-CLASE	:	ROSIDAE
ORDEN	:	MYRTALES
FAMILIA	:	COMBRATACEAE
GENERO	:	<i>Terminalia</i>
ESPECIE	:	<i>Terminalia catappa</i>

Las combretáceas son una familia del orden de las mirtales, que comprende alrededor de 600 especies de árboles, arbustos y trepadoras en 20 géneros. Su hábitat se extiende por los trópicos y subtrópicos; en ella se encuentran los géneros *Combretum*, *Laguncularia*, *Lumnitzera*, *Terminalia*, entre otros ⁽¹⁶³⁾.

Terminalia es un género de grandes árboles de la familia fanerógama de las combretáceas, con 100 especies distribuidas en regiones tropicales del mundo. Este género trae su nombre del latín *terminus*, debido a que sus hojas están muy al final de las ramas ⁽¹⁶⁴⁾.

Nombres comunes: Castañilla, almendro, almendro asiático, almendro de la costa, almendro de la india, almendro de tierra caliente, almendrón, almond ⁽¹⁶⁵⁾.

Descripción: Este árbol deciduo mide de 5 a 15 metros de alto. Sus ramas crecen en verticilos horizontales que forman como pisos de diferente altura. Su tronco, que puede medir hasta 60 cm de diámetro, presenta raíces tubulares poco pronunciadas. Su corteza de color gris es lisa y delgada, con el tiempo se vuelve agrietada. Su corteza interior es de color castaño claro y de sabor amargo. Sus hojas simples y alternas miden de 15 a 25 cm de largo y de 12 a 16 cm de ancho, y están aglomeradas cerca de los extremos de las ramas jóvenes. Sus flores son pequeñas de color blanco verdoso o castaño claro. Sus frutos son drupas de forma oval son carnosos y miden de 3 a 7 cm de largo y de 1,5 a 3 cm de ancho. Su semilla aceitosa mide en promedio 4 cm de largo. Su florescencia y su fructificación ocurre durante casi todo el año. Su madera es dura de color marrón rojizo ⁽¹⁶⁵⁾.

Distribución geográfica: Se encuentra desde el Asia tropical hasta Polinesia y ha sido naturalizada en América. En el Perú lo podemos encontrar en Cusco, Lima, Madre de Dios ⁽¹⁶⁶⁾ y también en Amazonas.

Composición química: Las hojas contienen varios flavonoides (como el kamferol o quercetina), varios taninos (tal como la punicalina, punicalagina o tercatina), saponinas y fitosteroles ⁽¹⁶⁴⁾.

Usos de la especie: En el lugar de recolección, según refiere el recolector, se usa de la siguiente manera: beber el cocimiento de las hojas para bajar la presión arterial. La corteza raspada o molida se toma para calmar la diarrea. Los cotiledones de las semillas secas se comen crudos para bajar el colesterol. Con esta misma finalidad se recomienda tomar el agua del cocimiento de las hojas.

Tiene un fruto alimenticio, es medicinal antidiarréica, útil contra las migrañas y los cólicos. Se usa como combustible en forma de leña y para procesos de reforestación mixtos en la recuperación de áreas degradadas. En Filipinas valoran las hojas rojas de esta especie como vermífugas, el fruto es purgativo y las hojas, mezcladas con aceite alivian los dolores de pecho. También se ha indicado que una preparación con la corteza del árbol, es utilizada contra las fiebres gástricas y como antidisentérico ⁽¹⁶⁵⁾.

2.4. Hipótesis

Las plantas en estudio tienen actividad antifúngica *in vitro* y es factible determinar la concentración mínima inhibitoria mediante microdilución en placa.

3. Materiales y Métodos

3.1. Tipo de Estudio: estudio observacional, descriptivo, transversal

3.2. Representación Gráfica del Estudio

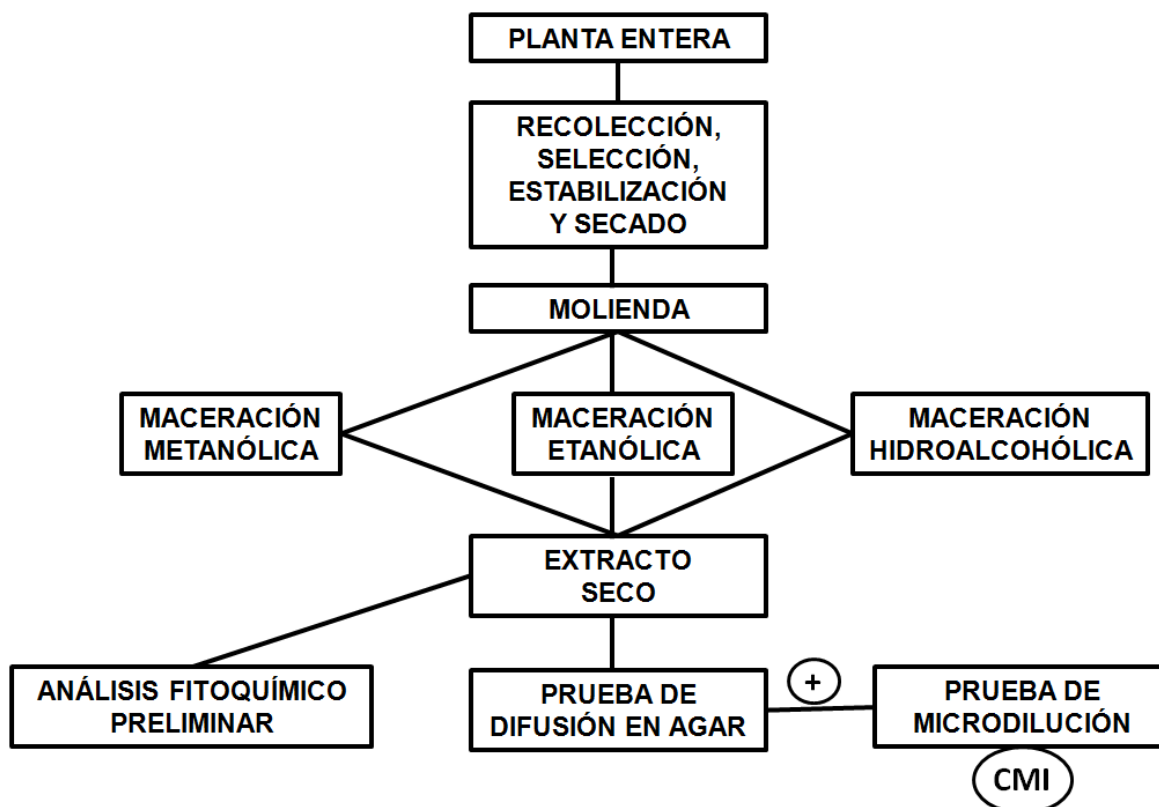


Figura 1. Diagrama de flujo de la metodología

3.3. Recolección de la especie

Las plantas que se describen en la Tabla 2 fueron recolectadas en los departamentos de Amazonas y Cajamarca el año 2004 y el verano del año 2007.

Las muestras de *Ilex guayusa* Loes, *Piper lineatum* y *Senna reticulata* Willd. fueron recolectadas en la Provincia de San Ignacio, Departamento de Cajamarca, entre los 900 y 1400 msnm; el *Hypericum laricifolium*, *Juglans neotropica* Diels, *Psidium guajava* y *Terminalia catappa* en la Provincia de Luya a 1200 - 2800 msnm y el *Piper spp.* en la provincia de Chachapoyas a 2500 msnm en el departamento de Amazonas.

Tabla 2. Plantas medicinales seleccionadas para el ensayo antifúngico

Especie	Familia	Nombre común	Parte usada
<i>Hypericum laricifolium</i>	Hypericaceae	Chinchango	Partes aéreas
<i>Ilex guayusa</i> Loes	Aquifoliaceae	Guayusa	Hojas
<i>Juglans neotropica</i>	Juglandaceae	Nogal	Corteza
<i>Piper spp.</i>	Piperaceae	Matico	Hojas
<i>Piper lineatum.</i>	Piperaceae	Luto	Hojas
<i>Psidium guajava</i>	Myrtaceae	Guayaba	Hojas
<i>Senna reticulata</i> Willd.	Fabaceae	Retama	Planta entera
<i>Terminalia catappa</i>	Combretaceae	Castañilla	Hojas

Los datos etnobotánicos y de recolección se resumen en la Tabla 3.

3.4. Identificación y autenticación de las especies

Las especies *Hypericum laricifolium*, *Juglans neotropica* Diels, *Piper spp.* y *Psidium guajava* fueron identificadas por la Dra. Graciela Vilcapoma Segovia en el Herbario Weberbauer de la Universidad Nacional Agraria de La Molina y las especies, *Ilex guayusa* Loes, *Piper lineatum*, *Senna reticulata* Willd. y *Terminalia catappa* fueron identificadas por el biólogo Jorge Campos, consultor botánico (ver constancias en los anexos 2 al 6).

3.5 Estabilización de la Muestra

El material recolectado fue acondicionado y estabilizado en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos a temperatura ambiente y en sombra aproximadamente por una semana. Las partes que se utilizaron son hojas, semillas, planta entera (ver tabla 2). Una vez estabilizada la muestra se sometió a un proceso de reducción de tamaño de partículas en un molino de cuchillas 21.

Tabla 3. Datos Etnobotánicos de las Plantas Investigadas

Nombre científico	Familia	Nombre común	Parte usada	Sitio de recolección *	Usos populares **
<i>Hypericum laricifolium</i>	Hypericaceae	Chinchango	Partes aéreas	Luya	Se utiliza para los "nervios"
<i>Ilex guayusa</i> Loes	Aquifoliaceae	Guayusa	Hojas	San Ignacio	Es estimulante del sistema nervioso, para la infertilidad y resfrios comunes
<i>Juglans neotropica</i> Diels	Juglandaceae	Nogal	Corteza	Luya	Se utiliza para la tos, como desinfectante y colorante
<i>Piper lineatum</i>	Piperaceae	Luto	Hojas	San Ignacio	Desinflamante, cicatrizante de heridas externas y procesos de úlceras gástricas; para lavados vaginales en casos de inflamaciones por micosis
<i>Piper spp.</i>	Piperaceae	Matico	Hojas	Chachapoyas	Las hojas se usan para limpiar la tos catarral y para la inflamación del hígado
<i>Psidium guajava</i>	Myrtaceae	Guayaba	Hojas	Luya	Las hojas hervidas se usan para cólicos y para limpiar los "bichos"
<i>Cassia reticulata</i> Wild	Fabaceae	Retama	Planta entera	San Ignacio	Tratamiento de la fiebre amarilla, sarna y las manchas de la piel
<i>Terminalia catappa</i>	Combretaceae	Castañilla	Hojas	Luya	Como hipotensor, para la diarrea, como hipocolesterolémico

* Sitios de recolección: San Ignacio, Departamento de Cajamarca; y Luya y Chachapoyas, Departamento de Amazonas ** Basado en datos obtenidos en el sitio de recolección

3.6. Evaluación fitoquímica preliminar

Se realizó mediante pruebas fitoquímicas de caracterización siguiendo las técnicas de Lock ⁽¹⁶⁷⁾. Entre los metabolitos secundarios buscados tenemos: quinonas, taninos, compuestos fenólicos, alcaloides, cumarinas, flavonoides y saponinas.

3.7. Preparación de los extractos:

Se trabajó con el polvo de la parte elegida de cada especie (ver Tabla 2), en la proporción de 10 g de droga por 90 mL del solvente respectivo. La extracción se realizó siguiendo el esquema de la Figura 1, por maceración a temperatura ambiente con etanol al 95%, metanol y solución hidro-alcohólica (70:30). Los solventes fueron luego evaporados a sequedad en un rotavapor a una temperatura más baja de 40 °C ⁽⁴⁴⁾. Para el bioensayo, los extractos fueron resuspendidos con dimetilsulfóxido a una concentración de 25 mg/mL.

3.8 Determinación de la Actividad Antifúngica de los Extractos Etanólico, Metanólico e Hidro-alcohólico de las Especies Estudiadas

3.8.1 Método de Difusión en Agar

Esta prueba se basa en la inhibición del crecimiento fúngico, mediante la difusión de las sustancias activas en un medio sólido y se evidencia por la formación de halos claros alrededor de las colonias ⁽⁴⁴⁾.

a) Hongos utilizados

Candida albicans ATCC 10231, *Aspergillus niger* ATCC 1640, y *Microsporum canis* ATCC cepa clínica, del laboratorio de Microbiología del Instituto de Química Biológica, Microbiología y Biotecnología “Marco Antonio Garrido Malo” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, UNMSM.

b) Preparación del inóculo

Para la preparación de la suspensión del inóculo, se utilizaron a los microorganismos crecidos en agar dextrosa Sabouraud de 48 h para la *Candida albicans*, de 72 h para el *Aspergillus niger* y de 1 semana para el caso del *Microsporum canis*. Se suspendieron los microorganismos en solución salina 0.85% estéril y se ajustó la turbidez al equivalente al tubo 0.5 de la escala de McFarland para *Candida albicans* y por cámara contadora de

células, hasta alcanzar el inóculo deseado (1×10^6 ufc/mL) para los otros hongos y se corroboró por conteo de diluciones seriales en placa ⁽⁴⁴⁾.

c) Preparación e inoculación de las placas

El medio agar dextrosa de Sabouraud previamente reconstituido, esterilizado, enfriado y mantenido a 45 °C, fue inoculado con 1 mL de suspensión del inóculo (1×10^6 ufc/mL) por cada 100 mL de medio de cultivo, homogenizado y distribuido en placas Petri de vidrio estériles de 90 mm de diámetro, a razón de 20 mL por placa. Se dejó solidificar y se rotuló con el nombre del microorganismo testigo. Finalmente se hicieron pozos con la ayuda de un sacabocado de acero de 11 mm de diámetro externo, en cada placa se hizo 2 ó 3 pozos equidistantes ⁽⁴⁴⁾.

d) Adición de las muestras e incubación de las placas

Se agregó 100 µL de los respectivos extractos (25 mg/mL) de las diferentes muestras en los pozos, se dejó reposar por 60 minutos a temperatura ambiente y se llevó incubación a 37°C por 24 h para *Candida albicans*, 72 h para *Aspergillus niger* y 1 semana para *Microsporum canis*.

e) Controles

Para el ensayo se usaron como controles positivos nistatina (0,2 mg/mL) y fluconazol (0,2 mg/mL) disueltos en DMSO (Dimetilsulfóxido) y agua respectivamente. Las pruebas se realizaron por triplicado ⁽⁴⁴⁾.

f) Lectura e interpretación de los resultados

Se observa las zonas claras de inhibición del crecimiento (halos) y se mide los diámetros en mm. Se considera que tiene una actividad antifúngica significativa a un halo de inhibición mayor a 18 mm ⁽⁴⁴⁾. Los extractos con actividad significativa fueron sometidos a la prueba de microdilución en placa para determinar su Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).

3.8.2 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) por el Método de Microdilución Colorimétrico en Microplaca

Se hizo una prueba de microdilución cuantitativa de las muestras y controles para determinar la menor concentración capaz de inhibir el crecimiento del hongo siguiendo los protocolos del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (Clinical and Laboratory

Standards Institute, CLSI). Para las pruebas con *Candida albicans* se usó el protocolo M27-A2 ⁽¹¹⁶⁾ y las modificaciones de Liu M y col. ⁽¹⁶⁸⁾; y para el *Microsporum canis* se usó el protocolo M38-A ⁽¹¹⁹⁾, con las modificaciones de Liu M y col. ⁽¹⁶⁸⁾ y Fernandez-Torres y col. ⁽¹⁶⁹⁾.

a) Hongos usados

Se usaron *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida albicans* cepa clínica y *Microsporum canis* cepa clínica.

b) Preparación de las muestras para las pruebas de microdilución

En la prueba de microdilución una solución de los extractos brutos diluïdos en DMSO a concentración de 100 mg/mL fueron diluidas en diluciones dobles seriadas, adaptando el esquema de diluciones de drogas insolubles en agua de los protocolos CLSI M27-A2 y CLSI M38-A; obteniendo 10 diluciones doblemente concentradas finales, que están en el rango de 7,8 – 4000 µg/mL de los 24 extractos trabajados. La concentración final de DMSO fue igual o inferior al 5% (v/v).

c) Preparación de las controles para las pruebas de microdilución

Los controles positivos utilizados para las pruebas fueron ketoconazol y fluconazol para las levaduras y fluconazol para el dermatofito. El ketoconazol soluble en DMSO fue preparado a 1600 µg/mL, siguiendo las normas del CLSI a una concentración mínima 100 veces mayor de la concentración a ser probada, en este caso 16 µg/mL. El fluconazol (soluble en agua) fue preparado a 640 µg/mL, siguiendo las normas, 10 veces la mayor concentración a ser probada, en este caso 64 µg/mL. La concentración de los controles fueron de 0,0313 – 16 µg/mL y de 0,125 – 64 µg/mL para ketoconazol y fluconazol respectivamente ⁽¹¹⁶⁾. El control de esterilidad fue el medio RPMI 1640 con resazurina de acuerdo al protocolo de Liu M y col. ⁽¹⁶⁸⁾.

d) Preparación del medio de cultivo RPMI 1640 para la prueba de microdilución

El medio de cultivo utilizado fue el RPMI 1640 con rojo de fenol y sin bicarbonato de sodio (SigmaAldrich), siguiendo las recomendaciones del CLSI. Para preparar 50 mL del medio RPMI 1640 se pesó asépticamente 0,52 g del medio RPMI 1640 y se disolvió en 45 mL agua destilada estéril, luego se pesó 1,73 g de MOPS (Sigma-Aldrich) y se añadió al preparado anterior, luego se agregó 5 mL de agua destilada estéril y finalmente se filtró

utilizando filtro de 0,22 μm ó 0,45 μm de porosidad. Luego fue almacenado en recipiente estéril y protegido de la luz a 4°C. Antes de usar el medio se verificó la ausencia de turbidez (ausencia de contaminación).

e) Preparación del inóculo de *Candida albicans*

A fin de obtener un mayor número de células viables, un repique de *Candida albicans* fue realizada 48 horas antes de la prueba de determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI). El día del ensayo, una pequeña alícuota de la levadura fue transferida a un tubo de ensayo conteniendo solución salina estéril 0,85%, hasta alcanzar un grado de turbidez semejante al tubo 0.5 de la escala de McFarland, que equivale a $1 - 5 \times 10^6$ ufc/mL (inóculo concentrado). En seguida se realizó una doble dilución, de 1:50 y de 1:20 con el medio RPMI 1640; para obtener un inóculo de $1 - 5 \times 10^3$ ufc/mL (inóculo 2x) ⁽¹⁶⁸⁾.

f) Preparación del inóculo de *Microsporium canis*

La preparación del inóculo se basó en las directrices de la CLSI M38-A, con las modificaciones de Fernández-Torres B. y col., 2002. A fin de obtener un mayor número de células viables, un repique de las cepas de *Microsporium canis* fue realizada 1 semana antes de la prueba de determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), se sembró en tubos de agar inclinado de agar dextrosa Sabouraud. El día del ensayo se agregó la cantidad suficiente de solución salina estéril 0.85% que cubra todas las colonias fúngicas del tubo, luego con la ayuda de un hisopo se ayudó a hacer la suspensión. Posteriormente la mezcla resultante de conidias y fragmentos hifales fueron retiradas y transferidas a un tubo estéril. Las partículas pesadas fueron dejadas sedimentar por 5 a 20 minutos, y las suspensiones superiores homogéneas fueron recogidas y mezcladas con un vortex. La densidad de estas suspensiones fueron ajustadas con un espectrofotómetro en una longitud de onda de 530 nm para obtener inóculos estandarizados a 65 a 70 % de transmitancia. Estas suspensiones stock fueron luego diluidas 1:50 en el medio RPMI para obtener un tamaño del inóculo de $1,2 \times 10^4$ a 6×10^4 UFC/mL. La cuantificación del inóculo se realizó por plaqueado de 0,01 mL de una dilución 1:100 del inóculo ajustado sobre placas de agar dextrosa Sabouraud ^(119 y 169).

g) Preparación de la Resazurina

La resazurina se preparó a una concentración de 20 mg/mL. Para la preparación de 10 mL de la solución de resazurina se pesó de manera aseptica 200 mg de resazurina, luego se

completó a con agua destilata estéril hasta los 10 mL, en una fiola estéril. Luego se filtró usando filtración de membrana con filtro de tamaño de poro de 0.22 μm . Posteriormente se almacenó en un recipiente de vidrio ambar estéril y se almacenó en refrigeración hasta su uso ⁽¹⁶⁸⁾.

h) Preparación del inóculo con el indicador resazurina

Para la prueba de microdilución se procedió teniendo en cuenta que por cada 20 mL de la suspensión del inóculo 2x se agregó 0,1 mL de la solución de resazurina 20 mg/mL ⁽¹⁶⁸⁾.

i) Procedimiento de la prueba de microdilución colorimétrica

La prueba de microdilución fue realizada en microplacas de 96 pozos estériles, de fondo en U (Brand). De manera general la distribución de las muestras se realizó teniendo en cuenta el diseño de la bandeja de microdilución (Tabla 4). En los pozos correspondientes a las muestras (B2-B11, C2-C11, D2-D11, E2-E11, F2-F11, y G2-G11) y a los controles Ketoconazol (A2-A11) y fluconazol (H2-H11), se colocan:

- 100 μL de la dilución 2x de la muestra o control correspondiente (ejemplo para el pozo A2, será 100 μL de 32 $\mu\text{g/mL}$ ketoconazol)
- 100 μL del inóculo 2x con indicador resazurina.

Por otro lado en los pozos de B1 – G1, se colocan 200 μL del medio RPMI 1640 con resazurina, sirviendo estos como control de esterilidad. Además en los pozos de la columna 12 (B12-G12), se colocan 100 μL del medio RPMI y 100 μL del inóculo 2x con indicador resazurina, sirviendo estos pozos como control de crecimiento.

j) Incubación de la placa

Las microplacas se incubaron a 37°C por 24 h para las cepas de *Candida albicans* y de 4 a 7 días para la cepa de *Microsporium canis*.

k) Lectura de los resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

La lectura de resultados se hizo visualmente. Cualquier cambio de color de púrpura a rosado o incoloro se registraron como positivos. La concentración más baja a la que no se produzca el cambio de color se tomó como el valor de la CMI. El promedio de tres valores fueron calculados y se reportaron como la CMI ⁽¹⁶⁸⁾. Para una correcta lectura se siguió las recomendaciones de Wiegand I. y col. ⁽¹⁷⁰⁾.

Tabla 4. Diseño de la bandeja de microdilución colorimétrica

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A		16.0	8.0	4.0	2.0	1.0	0.5	0.25	0.13	0.06	0.03		K
B	CE	2000	1000	500	250	125	62.5	31.25	15.63	7.81	3.91	CP	M1
C	CE	2000	1000	500	250	125	62.5	31.25	15.63	7.81	3.91	CP	M1
D	CE	2000	1000	500	250	125	62.5	31.25	15.63	7.81	3.91	CP	M2
E	CE	2000	1000	500	250	125	62.5	31.25	15.63	7.81	3.91	CP	M2
F	CE	2000	1000	500	250	125	62.5	31.25	15.63	7.81	3.91	CP	M3
G	CE	2000	1000	500	250	125	62.5	31.25	15.63	7.81	3.91	CP	M3
H		64.0	32.0	16.0	8.0	4.0	2.0	1.0	0.5	0.25	0.125		F

I) Interpretación de resultados

Para la interpretación de los resultados se tomó en cuenta los parámetros de Holetz FB. y col. ⁽¹⁷⁾. Se consideró que los extractos tenían una actividad antifúngica significativa cuando el CMI ≤ 1000 $\mu\text{g/mL}$. La actividad significativa se clasifica así:

- **Débil** actividad antifúngica: CMI de 500 a 1000 $\mu\text{g/mL}$
- **Moderada** actividad antifúngica: CMI de 100 a < 500 $\mu\text{g/mL}$
- **Buena** actividad antifúngica: CMI < 100 $\mu\text{g/mL}$

En cuanto a los controles de fluconazol y ketoconazol la interpretación se realizó teniendo en cuenta para la *Candida albicans* la normativa del CLSI M27-A2. Los puntos interpretativos para el ketoconazol para el *Microsporum canis* se adaptaron de la normativa CLSI M38-A2.

3.9 Organización de la información

En tablas y gráficos mediante números y porcentajes

3.10 Análisis estadístico

Se analizó mediante estadística descriptiva

3.11 Aspectos éticos y morales

Se consideró que no hubo problemas éticos ni morales

4. RESULTADOS

4.1. Análisis Fitoquímico Preliminar

El análisis fitoquímico preliminar reveló la presencia de compuestos fenólicos, taninos, flavonoides, cumarinas, alcaloides, quinonas y saponinas (metabolitos secundarios) (Tabla 5) en los extractos estudiados.

En las partes aéreas de *Hypericum laricifolium* se resalta la presencia de taninos, flavonoides y saponinas; en las hojas de *Ilex guayusa* Loes se resalta la ausencia de quinonas y la moderada presencia del resto de metabolitos investigados; en la corteza de *Juglans neotropica* Diels se resalta la presencia de quinonas, y además de compuestos fenólicos, taninos y cumarinas en el extracto metanólico; en las hojas de *Piper spp.* se observa la presencia de todos los metabolitos investigados en el extracto metanólico; en las hojas de *Piper lineatum* se resalta abundante presencia de compuestos fenólicos, taninos, flavonoides, cumarinas y alcaloides; en la planta entera de *Senna reticulata* Wild se resalta la presencia de saponinas y quinonas y la ausencia de compuestos fenólicos; en las hojas de *Psidium guajava* se resalta la presencia de todos los metabolitos investigados al igual que en las hojas de *Terminalia catappa*

Tabla 5. Análisis fitoquímico preliminar de las plantas en estudio

Especies de plantas	Partes de plantas ensayadas ^a	Tipo de extracto ^b	Compuestos fenólicos		Taninos (Gelatina)	Flavonoides Pb(CH ₃ COO) ₃	Cumarinas (NaOH 10%)	Alcaloides (Dragendorff)	Quinonas (Borntrager)	Saponinas (Afrosimétrico)
			[FeCl ₃]							
<i>Hypericum laricifolium</i>	PA	E	(++)	(++)	(-)	(++)	(-)	(++)	(-)	(+++)
	PA	M	(-)	(++)	(+++)	(-)	(-)	(++)	(-)	(+++)
	PA	HA	(+)	(++)	(+++)	(+++)	(+/-)	(-)	(+/-)	(+++)
<i>Ilex guayana</i> Loes	H	E	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(++)	(-)	(-)
	H	M	(-)	(++)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(++)
	H	HA	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
<i>Juglans neotropica</i> Diels	C	E	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++)	(-)
	C	M	(+++)	(++)	(-)	(-)	(+++)	(+)	(++)	(-)
	C	HA	(-)	(-)	(-)	(-)	(+/-)	(-)	(+)	(++)
<i>Piper spp.</i>	H	E	(-)	(++)	(-)	(-)	(+)	(+++)	(-)	(-)
	H	M	(++)	(++)	(++)	(++)	(+++)	(+)	(++)	(+++)
	H	HA	(+)	(-)	(-)	(+)	(+/-)	(+)	(+)	(+++)
<i>Piper lineatum</i>	H	E	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+++)	(+)	(-)
	H	M	(+++)	(++)	(++)	(+++)	(+++)	(++)	(-)	(-)
	H	HA	(+++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(+)	(-)	(-)
<i>Psidium guajava</i>	H	E	(+)	(++)	(++)	(+++)	(+)	(-)	(+/-)	(++)
	H	M	(-)	(++)	(++)	(++)	(+)	(+)	(+/-)	(++)
	H	HA	(++)	(++)	(++)	(++)	(+/-)	(+++)	(++)	(++)
<i>Senna reticulata</i> Wild	PE	E	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+++)	(++)
	PE	M	(-)	(+)	(+)	(+++)	(+++)	(+)	(+)	(+++)
	PE	HA	(-)	(+)	(+)	(-)	(+/-)	(+)	(+)	(++)
<i>Terminalia catappa</i>	H	E	(+++)	(++)	(+)	(+)	(+/-)	(++)	(+++)	(++)
	H	M	(+++)	(+)	(+++)	(+++)	(+/-)	(++)	(+++)	(-)
	H	HA	(+++)	(+++)	(++)	(++)	(+/-)	(++)	(+++)	(++)

Leyenda: (+++) Muy abundante; (++) Abundante; (+) positivo; (+/-) trazas; (-) negativo

(a) Partes de plantas ensayadas: PE, planta entera; H, hojas; PA, partes aéreas; C, corteza.

(b) Tipo de extracto: E, etanólico; M, metanólico; HA, hidroalcohólico.

4.2 Actividad Antifúngica

4.2.1 Método de difusión en Agar

Los resultados de la determinación antifúngica de los extractos en estudio por el método de difusión en agar, se presentan en la tabla 6 y las figuras 2 al 4.

En la tabla 6 y en las figuras 2 y 3, se aprecia que el 100 % de los extractos tiene un halo de inhibición ≥ 18 mm, que se interpretado como actividad significativa contra la *Candida albicans* ATCC 10231.

En la tabla 6 se observa que ninguno de los extractos tiene actividad contra la cepa de *Aspergillus niger* ATCC 16404.

En cuanto a la actividad de los extractos contra *Microsporum canis*, en la tabla 6 se destaca la muy buena actividad de los extractos de *Juglans neotropica* Diels, *Piper lineatum* y *Terminalia catappa* con halos de inhibición que superan los 18 mm y en el caso del extracto etanólico de *Piper lineatum* alcanza hasta los 48 mm. También es importante resaltar la inactividad de algunos extractos de *Hypericum laricifolium* y *Piper spp.*

Tabla 6. Actividades Antifúngicas de los extractos crudos de las plantas estudiadas por el método de difusión en agar

Especies de plantas	Partes de plantas ensayadas ^a	Tipo de extracto ^b	Diámetro del halo de inhibición (mm)		
			<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	<i>Microsporium canis clinica</i>
<i>Hypericum laricifolium</i>	PA	E	29	0	0
	PA	M	23	0	0
	PA	HA	20	0	25
<i>Ilex guayusa</i> Loes	H	E	21	0	0
	H	M	24	0	14
	H	HA	25	0	32
<i>Juglans neotropica</i> Diels	C	E	30	0	0
	C	M	30	0	40
	C	HA	27	0	15
<i>Piper spp.</i>	H	E	19	0	0
	H	M	22	0	0
	H	HA	20	0	0
<i>Piper lineatum</i>	H	E	22	0	48
	H	M	26	0	44
	H	HA	23	0	44
<i>Psidium guajava</i>	H	E	18	0	0
	H	M	28	0	26
	H	HA	27	0	0
<i>Senna reticulata</i> Wild	PE	E	21	0	15
	PE	M	20	0	14
	PE	HA	23	0	0
<i>Terminalia catappa</i>	H	E	18	0	24
	H	M	21	0	17
	H	HA	22	0	43
Controles					
DMSO			0	0	0
Nistatina (0,2 mg/mL)			37	40	45
Ketoconazol (0,2 mg/mL)			26	0	30

(a) Partes de plantas ensayadas: PE, planta entera; H, hojas; PA, partes aéreas; C, corteza.

(b) Tipo de extracto: E, etanólico; M, metanólico; HA, hidroalcohólico.

DMSO: Dimetilsulfóxido
(-): Inactivo

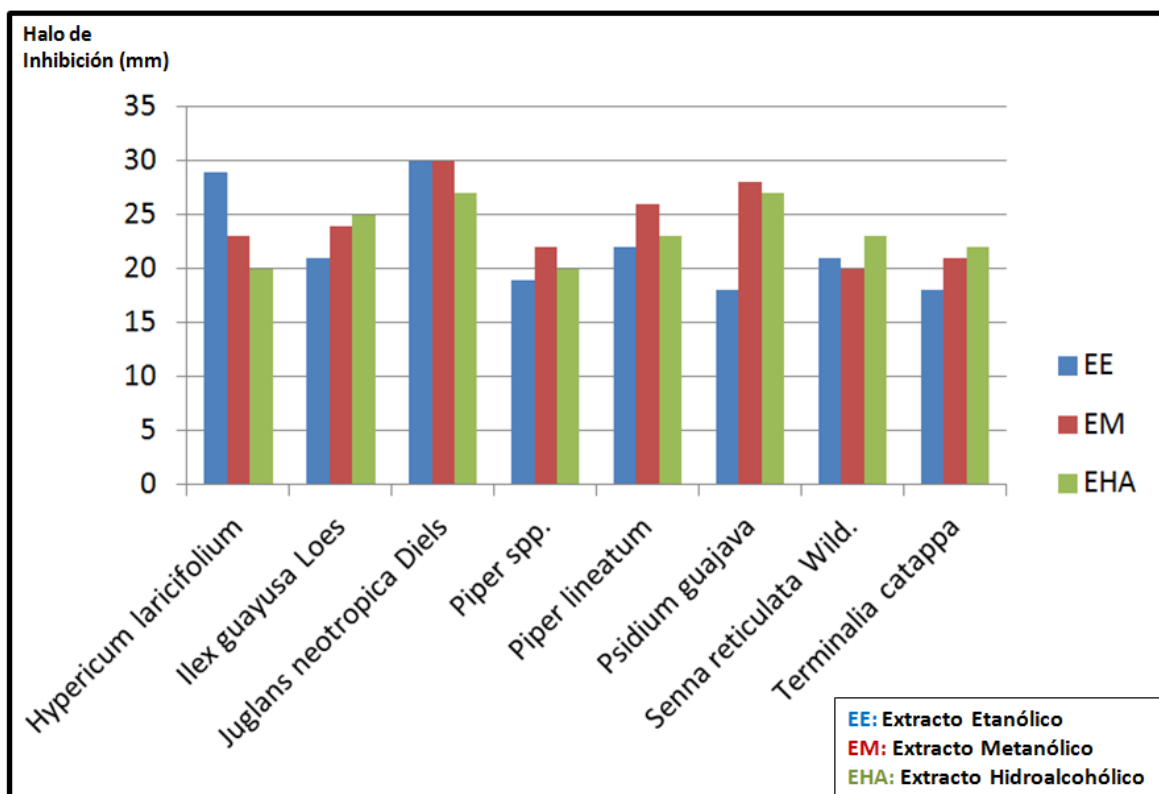


Figura 2. Determinación de la actividad antifúngica contra *Candida albicans* ATCC 10231 por el método de difusión en agar.

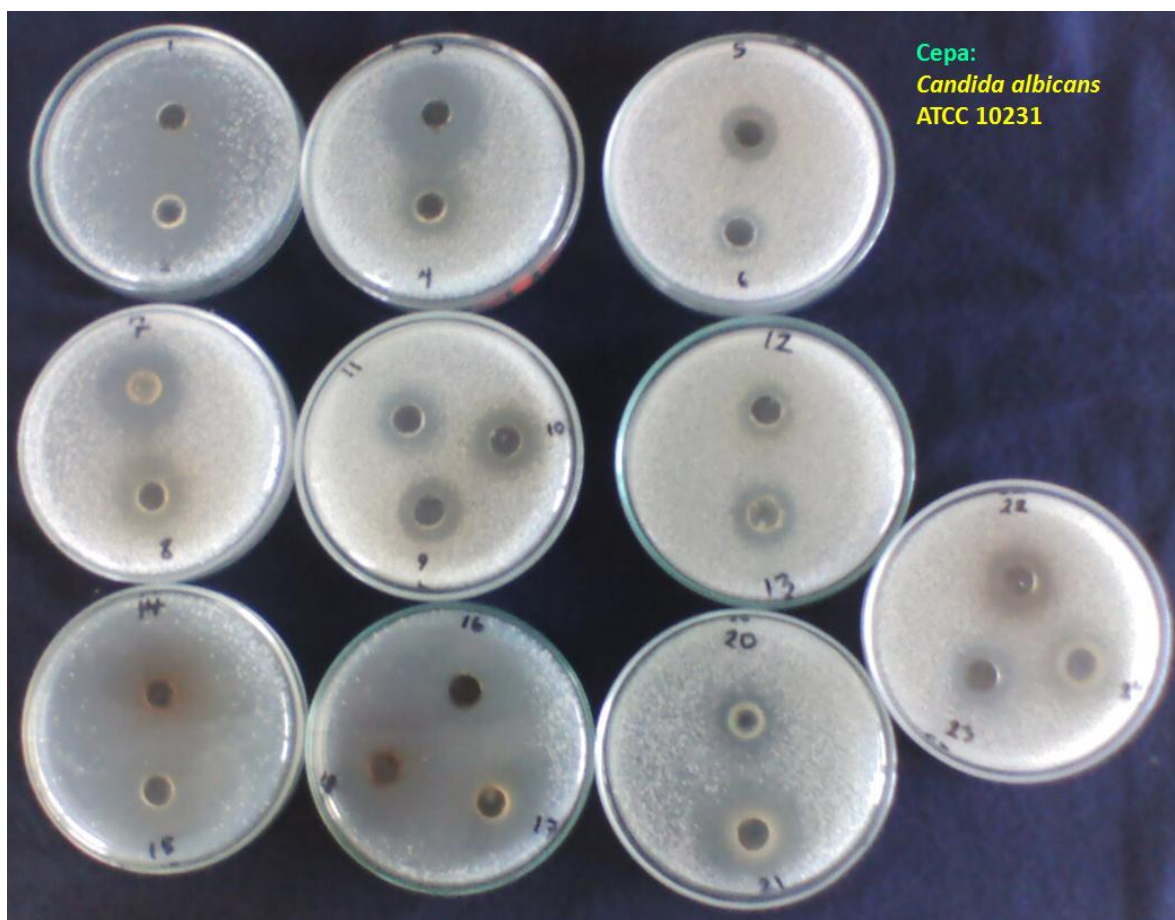


FIGURA 3. Actividad antifúngica de los extractos etanólicos de plantas a 25 mg/mL por el método de difusión en agar contra *Candida albicans* ATCC 10231

Leyenda: EM (Extracto metanólico), EE (Extracto etanólico), EHA (Extracto hidroalcohólico), PE (planta entera), PA (Partes aéreas), C (corteza) y H (hojas)

- 1: EM de *Senna reticulata* Wild (PE)
- 2: EM de *Ilex guayusa* Loes (H)
- 3: EM de *Piper lineatum* (H)
- 4: EM de *Terminalia catappa* (H)
- 5: EE de *Senna reticulata* Wild (PE)
- 6: EE de *Ilex guayusa* Loes (H)
- 7: EE de *Piper lineatum* (H)
- 8: EE de *Terminalia catappa* (H)
- 9: EHA de *Senna reticulata* Wild (PE)
- 10: EHA de *Ilex guayusa* Loes (H)
- 11: EHA de *Piper lineatum* (H)
- 12: EHA de *Terminalia catappa* (H)
- 13: EM de *Hypericum laricifolium* (PA)
- 14: EM de *Juglans neotropica* Diels (C)
- 15: EM de *Piper spp.* (H)
- 16: EM de *Psidium guajava* (H)
- 17: EE de *Hypericum laricifolium* (PA)
- 18: EE de *Juglans neotropica* Diels (C)
- 19: EE de *Piper spp.* (H)
- 20: EE de *Psidium guajava* (H)
- 21: EHA de *Hypericum laricifolium* (PA)
- 22: EHA de *Juglans neotropica* Diels (C)
- 23: EHA de *Piper spp.* (H)
- 24: EHA de *Psidium guajava* (H)



FIGURA 4. Actividad antifúngica de los extractos de plantas a 25 mg/mL por el método de difusión en agar contra *Microsporium canis*

Leyenda: M.c. (*Microsporium canis*)

- 12: Extracto hidroalcohólico de *Terminalia catappa* (Hojas)
- 13: Extracto metanólico de *Hypericum laricifolium* (Partes aéreas)
- 14: Extracto metanólico de *Juglans neotropica* Diels (Corteza)

4.3. CMI por el Método de Microdilución Colorimétrico en Microplaca

Los resultados de la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) por el método de microdilución colorimétrica de los extractos en estudio se presentan en la tabla 7 y las figuras 5 a 10.

En la tabla 7 y las figuras 5 y 6 se observa que con excepción de los extractos metanólico e hidroalcohólico de *Hypericum laricifolium*, el extracto metanólico de *Ilex guayusa* Loes y los 3 extractos de *Senna reticulata*; todos los extractos estudiados tiene una CMI ≤ 1000 $\mu\text{g/mL}$ contra *Candida albicans* ATCC 10231 y *Candida albicans* clínica, lo que representa el 75% de los extractos estudiados.

En la tabla 7 y la figura 9, se observa que todos los extractos del estudios tienen una CMI ≤ 1000 $\mu\text{g/mL}$ contra *Microsporium canis* cepa clínica. En la figura 9 se observa que excepto los 3 extractos de *Hypericum laricifolium*; los extractos metanólico y etanólico de *Ilex guayusa* Loes; y los extractos hidroalcohólicos de *Piper spp.* y *Psidium guajava*; todo el resto de extractos tiene una < 100 $\mu\text{g/mL}$ contra el *Microsporium canis* cepa clínica.

Tabla 7. Valores de la Concentración Mínima Inhibitoria sobre *Candida albicans* y *Microsporium canis* de los 24 extractos crudos

Especies de plantas	Partes de plantas ensayadas ^a	Tipo de extracto ^b	Concentración Mínima Inhibitoria (ug/mL)		
			<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	<i>Candida albicans</i> clínica	<i>Microsporium canis</i>
<i>Hypericum loricifolium</i>	PA	E	250	250	125
	PA	M	> 2000	> 2000	125
	PA	HA	> 2000	> 2000	125
<i>Ilex guayusa</i> Loes	H	E	250	250	125
	H	M	2000	1000	125
	H	HA	250	250	62.5
<i>Juglans neotropica</i> Diels	C	E	15.625	15.625	62.5
	C	M	7.81	7.81	31.25
	C	HA	31.25	31.25	62.5
<i>Piper spp.</i>	H	E	500	500	62.5
	H	M	31.25	31.25	62.5
	H	HA	1000	> 2000	125
<i>Piper lineatum</i>	H	E	250	250	15.625
	H	M	500	500	15.625
	H	HA	250	250	7.81
<i>Psidium guajava</i>	H	E	31.25	31.25	31.25
	H	M	125	125	62.5
	H	HA	15.625	15.625	125
<i>Senna reticulata</i> Wild	PE	E	> 2000	> 2000	62.5
	PE	M	> 2000	> 2000	62.5
	PE	HA	> 2000	> 2000	3.91
<i>Terminalia catappa</i>	H	E	7.81	15.625	7.81
	H	M	62.5	62.5	62.5
	H	HA	15.625	15.625	7.8
Controles					
Ketoconazol			0.03	0.25	0.13
Fluconazol			0.25	16	

(a) Partes de plantas ensayadas: PE, planta entera; H, hojas; PA, partes aéreas; C, corteza.

(b) Tipo de extracto: E, etanólico; M, metanólico; HA, hidroalcohólico.

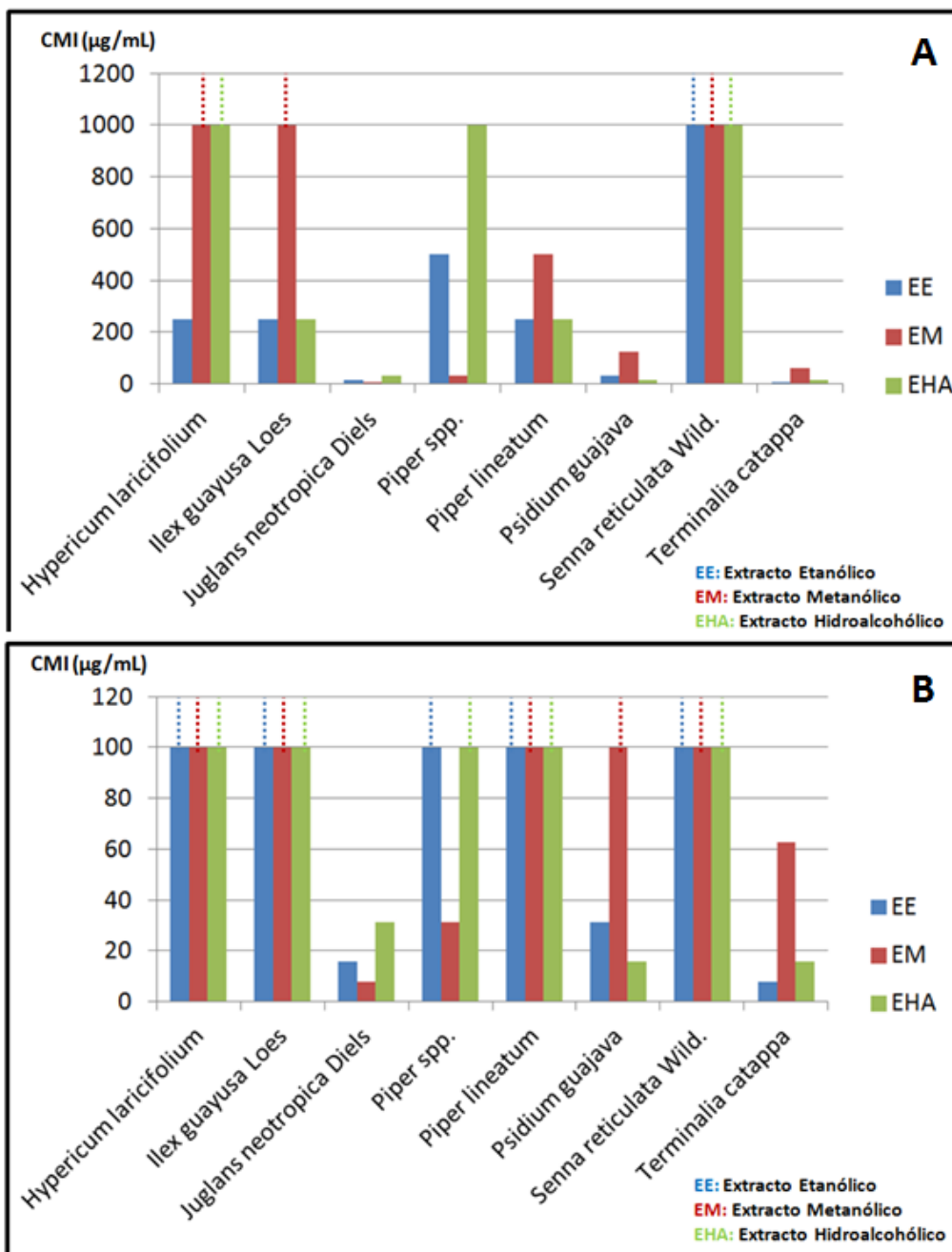


Figura 5. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los extractos de las plantas en estudio contra *Candida albicans* ATCC 10231

Leyenda: En el eje las ordenadas se ubica a la CMI en µg/mL y en el eje de las abscisas se ubican los extractos de las plantas en estudio.

A: La escala de las ordenadas llega hasta 1200 µg/mL

B: La escala de las ordenadas llega hasta 120 µg/mL

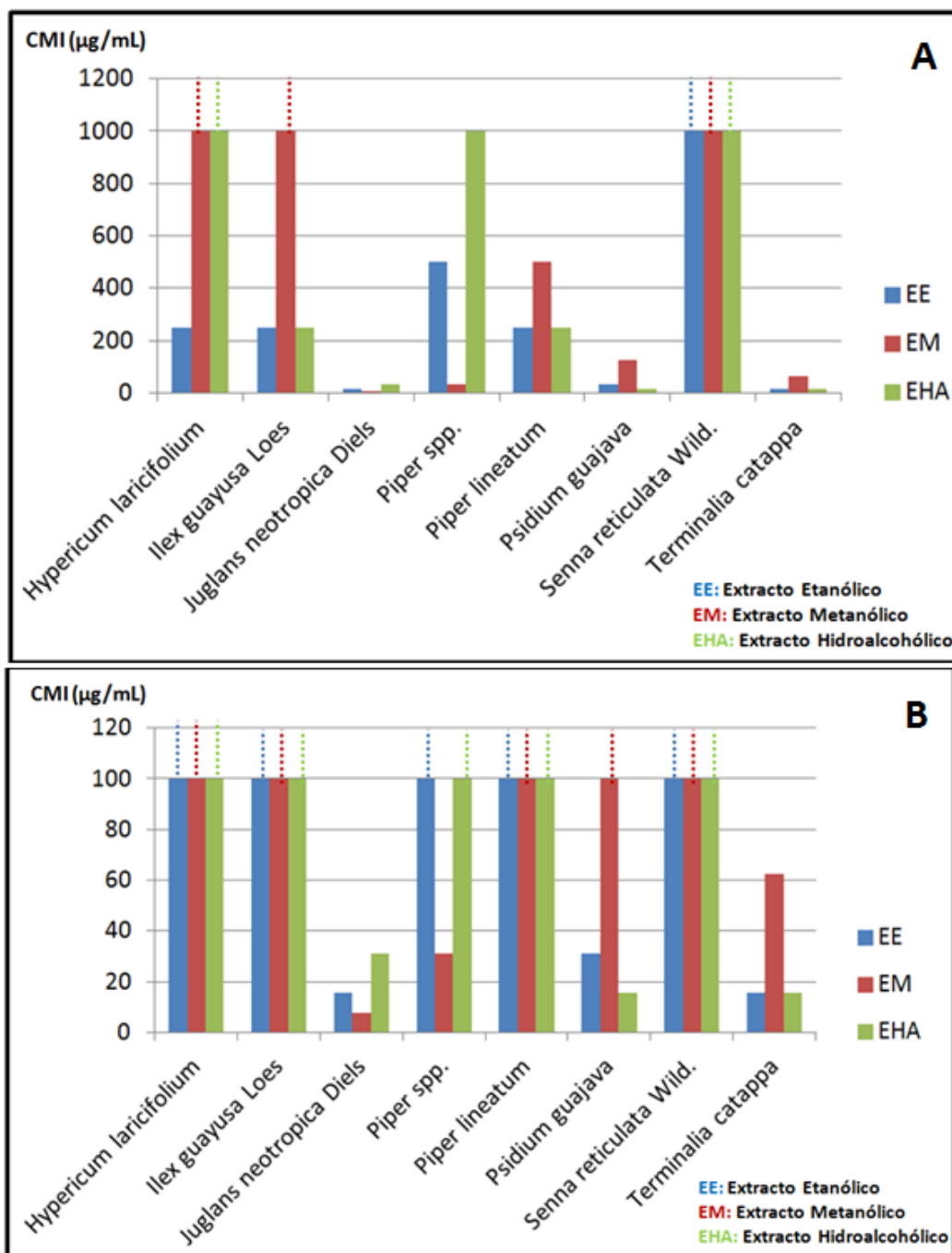


Figura 6. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los extractos de las plantas en estudio contra *Candida albicans* clínica

Leyenda: En el eje las ordenadas se ubica a la CMI en µg/mL y en el eje de las abscisas se ubican los extractos de las plantas en estudio.

A: La escala de las ordenadas llega hasta 1200 µg/mL

B: La escala de las ordenadas llega hasta 120 µg/mL

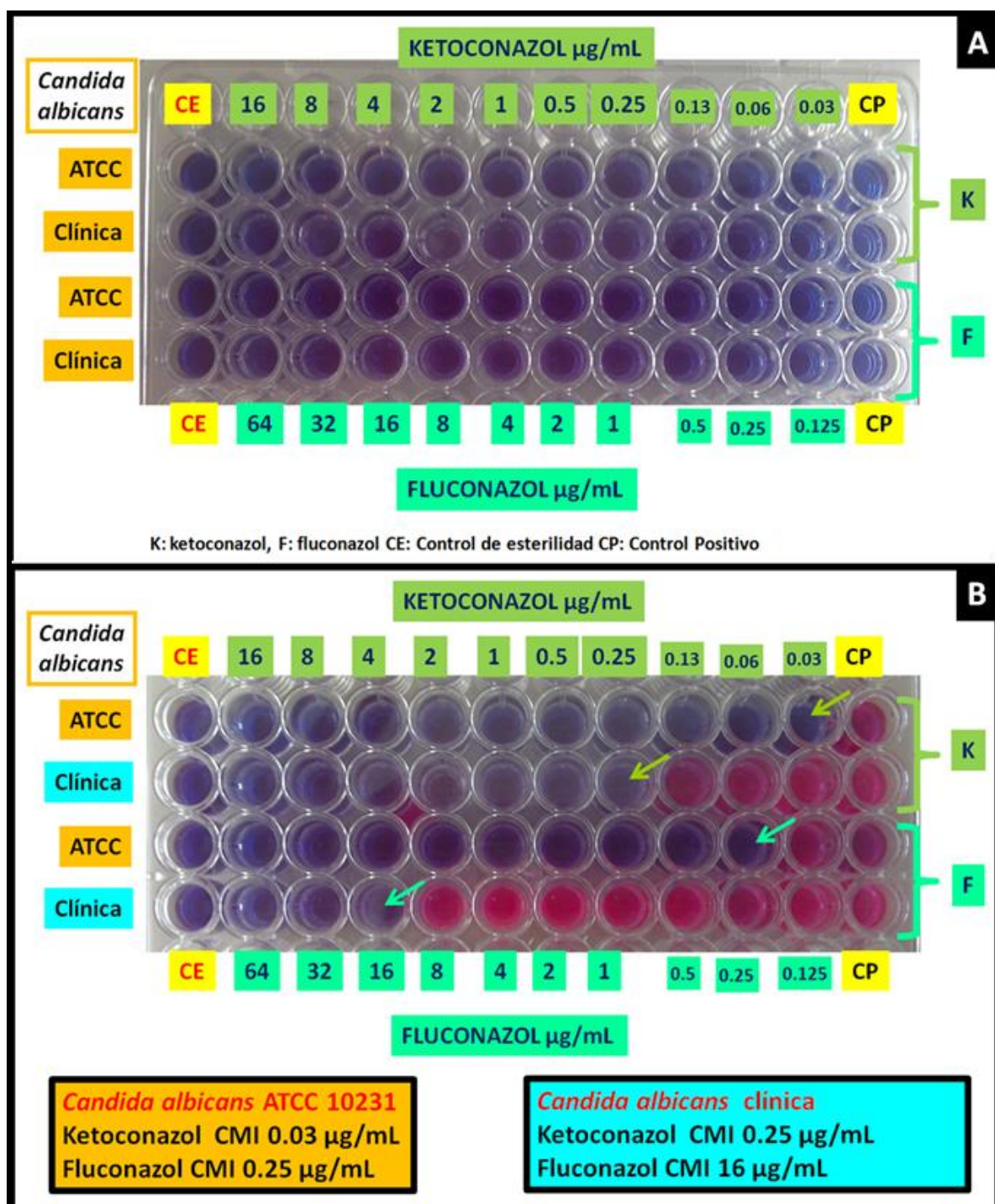


FIGURA 7. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de los controles por el método de microdilución colorimétrico contra *Candida albicans*

A: Microplaca antes de incubar

B: Microplaca después de incubar

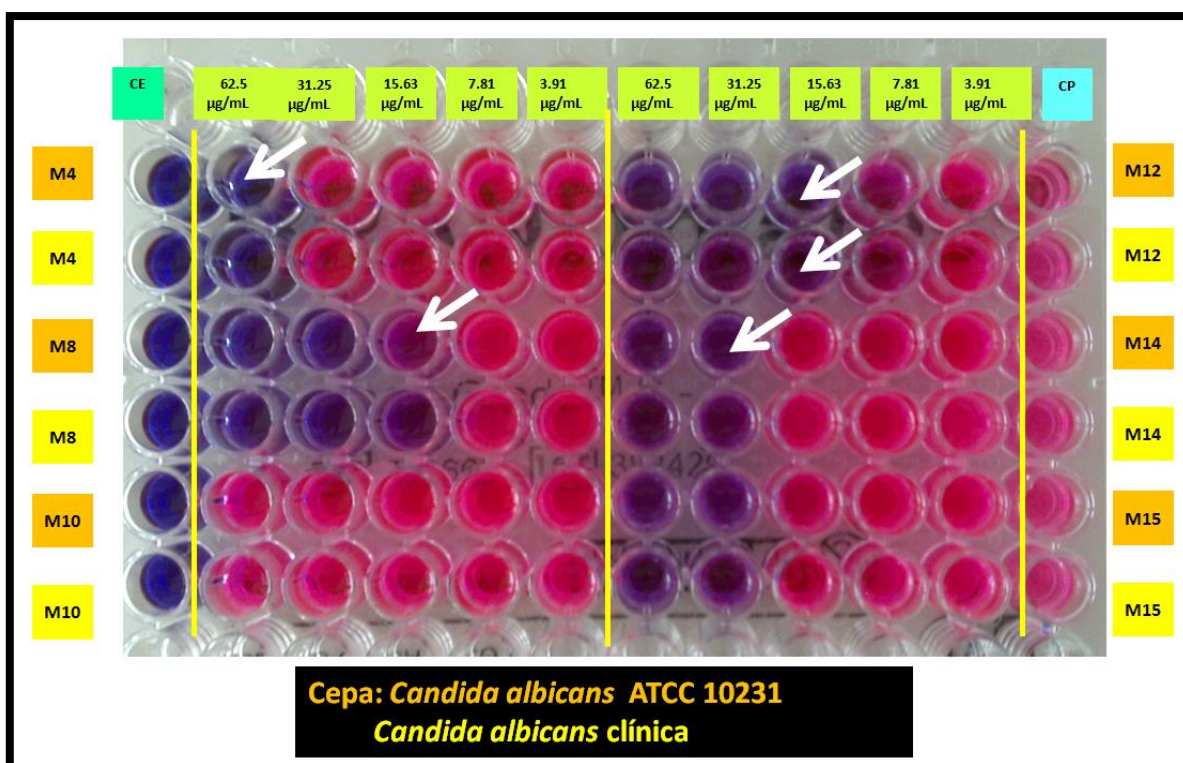


FIGURA 8. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de algunos extractos por el método de microdilución colorimétrico contra *Candida albicans*

Leyenda: CE (Control de esterilidad), CP (Control Positivo)

Flecha blanca: indica la Concentración Mínima Inhibitoria

- M4: Extracto Metanólico de *Terminalia catappa* (Hojas)
- M8: Extracto Etanólico de *Terminalia catappa* (Hojas)
- M10: Extracto Hidroalcohólico de *Ilex guayusa* Loes (Hojas)
- M12: Extracto Hidroalcohólico de *Terminalia catappa* (Hojas)
- M14: Extracto Metanólico de *Juglans neotropica* Diels (Corteza)
- M15: Extracto Metanólico de *Piper spp.* (Hojas)

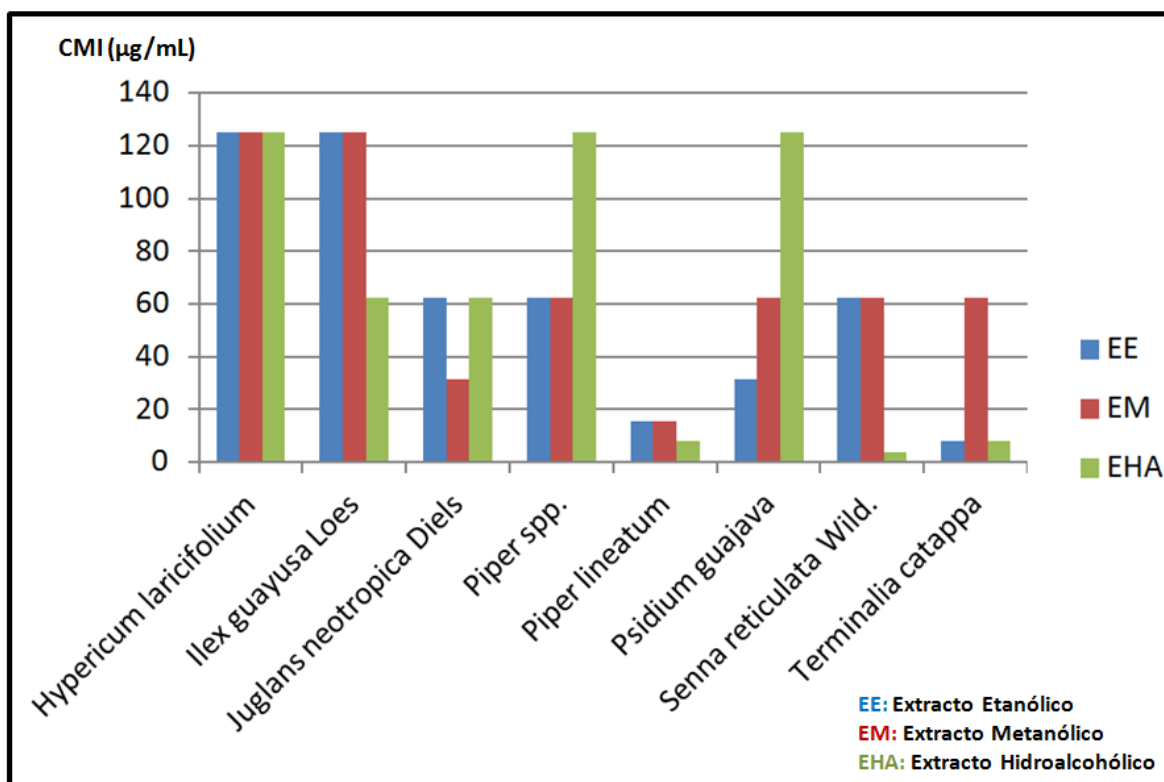


Figura 9. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los extractos de las plantas en estudio contra *Microsporium canis* cepa clínica

Leyenda: En el eje las ordenadas se ubica a la CMI en µg/mL y en el eje de las abscisas se ubican los extractos de las plantas en estudio.

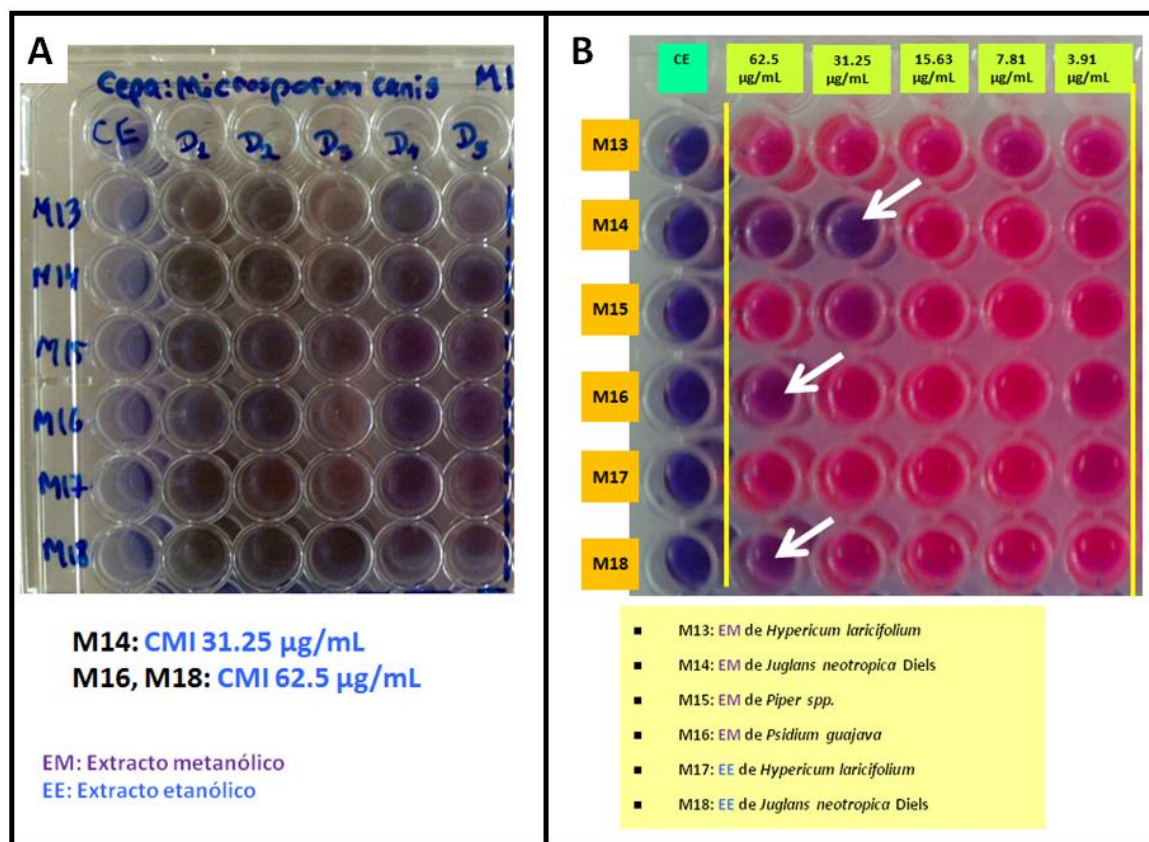


FIGURA 10. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de algunos extractos por el método de microdilución colorimétrico contra *Microsporium canis*

Leyenda: CE (Control de esterilidad), CP (Control Positivo)

Flecha blanca: indica la Concentración Mínima Inhibitoria

A: Microplaca antes de incubación

B: Microplaca después de incubación

5. DISCUSIÓN

Las plantas investigadas se usan en medicina tradicional en las zonas de recolección, tal como se observa en la tabla 3; para problemas dérmicos e infecciosos. Los resultados de la prueba de microdilución en microplaca demuestran que el 75% (18) de las plantas investigadas tienen actividad antifúngica contra *Candida albicans* ATCC 10231 y *Candida albicans* de aislado clínico, y el 100 % (24) contra *Microsporum canis* cepa clínica. Esto avala el potencial que tienen estas plantas como antifúngicos; así como una acertada selección basada en gran parte en su quimiotaxonomía y uso etnomedicinal.

Hypericum laricifolium

El extracto etanólico de las partes aéreas de *Hypericum laricifolium* tiene actividad contra *Candida albicans* (CMI= 250 µg/mL); este resultado es similar al reportado en un estudio previo utilizando el método de dilución en agar ⁽⁹⁾ y a los encontrados en extractos de *Hypericum perforatum* ⁽¹⁷¹⁾. Por otro lado los 3 extractos trabajados fueron activos contra *Microsporum canis* (CMI= 125 µg/mL); siendo este el primer reporte sobre esta actividad; los resultados son similares a los reportados para los extractos de hexano y clorofórmico de *Hypericum terneum* ⁽¹⁰⁾. En el estudio fitoquímico preliminar se demostró la presencia de taninos y saponinas principalmente, las que serían responsables de la actividad biológica. Los estudios en este género han atribuido el poder antifúngico a xantonas, la hiperperforina, hipericina, y quercetina ⁽¹⁷²⁻¹⁷⁴⁾.

Ilex guayusa Loes

Los extractos etanólicos e hidroalcohólicos de las hojas de *Ilex guayusa* Loes, mostraron una regular actividad contra ambas cepas de *Candida* (250 µg/mL), además los 3 extractos de esta planta fueron activos contra *Microsporum canis* (62.5-125 µg/mL); resultados por primera vez reportados en la literatura. Los resultados pueden equipararse a los encontrados para el extracto acuoso de *ilex paraguariensis*, activo contra *Malassezia furfur* ⁽¹⁷⁵⁾ y a los frutos de *Ilex integra*, activos contra *Candida albicans* ⁽¹²⁾. El *Ilex paraguariensis* también es activo contra *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*,

virus del herpes simple y virus de la rabia ^(176 y 177). Se atribuye la acción antimicrobiana del género *Ilex* a los triterpenos, en especial al ácido rotúndico ⁽¹²⁾.

***Juglans neotropica* Diels**

Los tres extractos de la corteza *Juglans neotropica* Diels tienen muy buena acción contra las dos cepas de *Candida albicans* y el *Microsporum canis* con una CMI ≤ 100 $\mu\text{g/mL}$ y no presentaron actividad contra *Aspergillus niger*. Estos resultados concuerdan con los estudios realizados por Huamani & Ruiz, donde se demuestra que el extracto etanólico de la corteza de *Juglans neotropica* Diels tiene una CMI de 250 $\mu\text{g/mL}$ contra *Candida albicans* ATCC 10231, y López et al. con el extracto metanólico ^(9 y 14); adicionalmente se ha reportado que los extractos metanólico y de etil acetato de *Juglans regia* L. tienen actividad contra especies de *Candida* (CMI= 6-195 $\mu\text{g/mL}$) ⁽¹⁷⁸⁾, y *Cryptococcus neoformans* ⁽¹⁷⁹⁾, al igual que contra *Microsporum canis* y *Trichophyton violaceum*, y en más de 90% de *Trichophyton mentagrophytes* ⁽¹⁸⁰⁾. Por otro lado el extracto etanólico de la corteza de *Juglans cinerea* tiene actividad contra *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Trichophyton mentagrophytes*, y *Microsporum gypseum* ⁽¹⁸¹⁾. El análisis fitoquímico preliminar revela la presencia quinonas, cumarinas, taninos, compuestos fenólicos, y flavonoides los cuales pueden ser los responsables de la actividad biológica. La quercetina, eugenol, beta-sitosterol encontrados en *J. regia* tienen actividad candidacida.

Piper spp.* y *Piper lineatum

Los extractos etanólico y metanólico de las hojas de *Piper spp.* mostraron una actividad significativa contra las dos cepas de *Candida albicans* (CMI ≤ 1000 $\mu\text{g/mL}$), y los 3 extractos de *Piper spp.* mostraron una muy buena actividad contra el *Microsporum canis* (CMI ≤ 100 $\mu\text{g/mL}$); ningún extracto mostró actividad contra *Aspergillus niger* y el extracto hidroalcohólico tiene apenas actividad contra *Candida albicans* ATCC 10231 y es inactivo contra la *Candida albicans* cepa clínica. Por otro lado todos los extractos de *Piper lineatum* fueron activos contra las cepas de *Candida albicans* (CMI ≤ 1000 $\mu\text{g/mL}$) y *Microsporum canis* (CMI ≤ 100 $\mu\text{g/mL}$). Los resultados concuerdan con el trabajo de Huamani, que encontró un CMI= 250 $\mu\text{g/mL}$ para el extracto etanólico de las hojas de

Piper spp contra *Candida albicans* ATCC 10231, pero donde trabajaron con el método de dilución en agar ⁽⁹⁾; por otro lado se ha reportado que los extractos etanólico, metanólico e hidroalcohólico de las hojas de *Piper lineatum* (luto) mostraron actividad significativa contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Candida albicans* y *Microsporum canis* ⁽¹⁸²⁾. Los resultados encontrados concuerdan con los reportados para otras plantas del género *Piper*; Bhadauria S. et al. 2012, reportaron que los extractos y los flavonoides de *Piper betle* fueron efectivos contra dermatofitos (*Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* y *Microsporum gypseum*) y *Candida albicans* ⁽¹⁸³⁾ y Koroishi AM. y col. 2008, reportaron que el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Piper regnellii* fueron activos contra los dermatofitos *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* y *Microsporum gypseum* con una CMI de 15.62 µg/mL, y de 62.5 µg/mL para *Microsporum canis* ⁽¹⁸⁴⁾. El análisis fitoquímico preliminar revela la presencia de taninos, compuestos fenólicos, flavonoides, cumarinas y alcaloides entre sus principales constituyentes, los cuales pueden ser los responsables de la actividad biológica. En este género se han reportado los siguientes compuestos antifúngicos: ácido crasinérvico ⁽¹⁸⁵⁾, cromonas, esteroides, flavonoides ⁽¹⁸⁶⁾, hidroquinonas preniladas y sakuretina ⁽¹⁵⁾, canfor y canfeno principales constituyentes del aceite esencial de *Piper angustifolium* ⁽¹⁸⁷⁾, numerosas amidas ^(16, 188-190), derivados del ácido benzoico ⁽¹⁹¹⁾, lignanos ^(192 y 193), y derivados ciclopentanodionas (coruscanona A y B) ⁽¹⁹⁴⁾. Todos estos resultados remarcan el gran potencial del género en este campo de la investigación, el cual debe ser profundizado.

Psidium guajava

Todos los extractos de las hojas de *Psidium guajava* mostraron una muy buena actividad antifúngica (CMI ≤ 100 µg/mL) contra las 2 cepas de *Candida albicans* y el *Microsporum canis* y fueron inactivas contra *Aspergillus niger*. Los resultados concuerdan con los encontrados por Dhiman A. et al. 2011, que detectó actividad del extracto metanólico de las hojas de *Psidium guajava* contra *Candida albicans* (CMI= 12.5 µg/mL) ⁽¹⁹⁵⁾ y Holetz FB. et al. encontró un CMI de 125 µg/mL ⁽¹⁷⁾. Por otro lado Alves PM. y col. 2009, reportaron la actividad de *Psidium guajava* contra biopelículas orales de *Candida albicans* ⁽¹⁹⁶⁾. Adicionalmente Camacho-Hernandez IL. et al. 2004, reportaron que el extracto metanólico de la pulpa de la fruta de *Psidium sartorianum* fue activo contra

especies de *Trichophyton* ⁽¹⁹⁷⁾. El análisis fitoquímico preliminar reveló la presencia de taninos, compuestos fenólicos, alcaloides, flavonoides, y saponinas; los cuales podrían explicar la actividad biológica de la planta ⁽¹⁹⁸⁾. La quercetina ⁽¹⁹⁹⁾ y aceites esenciales (cariofileno, etc.) ⁽²⁰⁰⁾, tienen propiedades candidacidas y fungicidas.

***Senna reticulata* (retama)**

Los extractos etanólico, metanólico e hidroalcohólico de la planta entera de *Senna reticulata* (retama) no mostraron actividad significativa contra las cepas de *Candida albicans*. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Oliveira (2009), que no encontró actividad contra *Candida albicans* por parte de los extractos hidroalcohólicos de hojas y corteza de *Senna reticulata* usando un método del CMI similar al de mi tesis ⁽¹⁶²⁾, Ogundare OA. (2009), tampoco encontró actividad contra *Candida albicans* en el extracto metanólico de las hojas de *Senna podocarpa* ⁽²⁰¹⁾. Por otro lado Noguera LG. reportó que el extracto etanólico de las hojas de *Senna macranthera* tiene un CMI de 5 mg/mL contra *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans* ⁽²⁰²⁾ y Doughari et al. (2008) demostraron que el extracto acuoso de las hojas de *Senna obtusifolia* tiene un CMI de 600 µg/mL contra *Candida albicans* y de 2000 µg/mL contra *Aspergillus niger* ⁽²⁰³⁾. Con respecto a la actividad contra dermatofitos, los 3 extractos de *Senna reticulata* tuvieron una CMI ≤ 100 µg/mL contra *Microsporum canis*, valores que lo sitúan como extractos con buena actividad antidermatodítica, estos resultados difieren de los encontrados por Oliveira que encontró un CMI = 6.25 mg/mL contra *M. canis* y *T. rubrum* y de 3.13 mg/mL contra *T. mentagrophytes* ⁽¹⁶²⁾, valores mucho más elevados de los encontrados en la presente tesis. En el género *Cassia* que está relacionado al género *Senna*, también encontramos resultados similares al de la tesis, por ejemplo los extractos acuosos de *Cassia grandis* y *Cassia occidentalis* ⁽³⁷⁾ tienen actividad contra *Epidermophyton floccosum* y *Trichophyton rubrum* (CMI= 50 µg/mL) y el extracto de las flores de *Cassia fistula* tiene actividad contra *Epidermophyton floccosum* y *Trichophyton mentagrophytes* (CMI= 500 µg/mL) ⁽²⁰⁴⁾; sin embargo estas últimas en menor medida que las obtenidas en el presente estudio. En reportes previos se atribuye el efecto antifúngico del género *Senna* a antraquinonas, flavonoides, saponinas, y compuestos fenólicos ^(162 y 203); lo que explicaría probablemente el

efecto de los extractos de *Senna reticulata* contra el *Microsporum canis*, al ser rico en estos metabolitos secundarios, como lo evidencia lo hallado en la investigación.

Terminalia catappa

Los extractos etanólico, metanólico e hidroalcohólico de las hojas de *Terminalia catappa* (castañilla) mostraron muy buena actividad ($\text{CMI} \leq 100 \mu\text{g/mL}$) contra las cepas de *Candida albicans* y *Microsporum canis*, pero fueron inactivas contra *Aspergillus niger*. Los resultados encontrados son similares a los reportados por Nair et al. 2008 que encontró que el extracto metanólico de las hojas de *Terminalia catappa* fue activo contra *Candida tropicalis* por el método de difusión en agar ⁽²⁰⁵⁾; también se ha reportado actividad antifúngica en otras especies del género *Terminalia*; Aneja KR. et al. 2012, reportaron que los extractos metanólicos, etanólicos, acetónico y acuoso de hojas y corteza de *Terminalia arjuna* fueron activos contra *Candida albicans* ⁽²⁰⁶⁾; Mann A. et al. 2008, reportaron que el extracto etanólico de las raíces de *Terminalia avicennioides* fueron activos contra *Aspergillus niger*, *Microsporum audouinii* y *Trichophyton rubrum* ($\text{CMI} = 0.03\text{-}0.07 \mu\text{g/mL}$) ⁽²⁰⁷⁾ y Masoko P. et al. 2005, reportaron que el extracto metanólico y acetónico de *Terminalia sericea* fueron activos contra *Candida albicans* ($\text{CMI} = 80 \mu\text{g/mL}$) y *Microsporum canis* ($\text{CMI} = 20 \mu\text{g/mL}$) ⁽⁴¹⁾. El análisis fitoquímico preliminar revela gran presencia de compuestos fenólicos, taninos, flavonoides, alcaloides y quinonas; lo que podría explicar su efecto antifúngico y que se sustenta en lo reportado en la literatura en otras especies de *Terminalia*, así la planta *Terminalia avicennioides* es rica en taninos y saponinas, lo que explicaría su actividad contra cepas de *Candida* y dermatofitos ⁽⁴⁰⁾. De los extractos de frutos de *Terminalia bellirica* se aislaron lignanos que poseen actividad antifúngica (208). *Terminalia sericea* y *T. brachystemma* originarios de Sudáfrica tienen compuestos antifúngicos de naturaleza apolar contra *Microsporum canis* ⁽⁴¹⁾.

Método de difusión en agar

El método de difusión en agar usado en la presente tesis mostró buenos resultados en la evaluación de la actividad antifúngica contra *Candida albicans* y *Aspergillus niger*, similares a los reportados por Rojas et col. ⁽⁴⁴⁾. Sin embargo los resultados obtenidos contra el *Microsporum canis*, no son homogéneos, ya que en una misma planta y con diferentes

extractos muestra resultados diferentes, que cuando se evaluó bajo el método de microdilución colorimétrico. Entre otras razones para explicar este resultado se puede mencionar a la naturaleza de los extractos, el volumen de agar usado, el tamaño de inóculo usado y el tiempo de incubación ⁽²⁰⁹⁾. El mayor tiempo de incubación, necesario para la evaluación de dermatofitos, perjudica al análisis. Por otro lado el método de difusión en agar requiere relativamente mayores cantidades de muestra y es incómodo para trabajar gran número de muestras respecto a los métodos de microdilución ⁽²¹⁰⁾.

Método de microdilución

Los resultados obtenidos por el método de microdilución en placa colorimétrico, usando resazurina como indicador de lectura, fueron excelentes tanto para la evaluación de la susceptibilidad antifúngica contra *Candida albicans*, como contra *Microsporum canis*; y concuerdan con el método de Liu et al. ⁽¹⁶⁸⁾. Los métodos de microdilución para levaduras, hongos filamentosos y dermatofitos; han sido estandarizados hace pocos años en especial por la CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) ^(116 y 119), y la EUCAST (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) ^(117 y 118) para antifúngicos puros, al trabajar con extractos de plantas, surge el inconveniente de que el color o la precipitación pueden enmascarar el crecimiento del microorganismo ⁽²¹⁰⁾; por lo que es necesario usar modificaciones de estos métodos para subsanar este impase, se puede hacer de 2 maneras usando una lectura espectrofotométrica o por lectura colorimétrica; en la tesis se prefirió usar la lectura colorimétrica respecto a la espectrofotométrica por limitaciones de equipamiento y por practicidad, pero mostrando resultados reproducibles usando la lectura colorimétrica, tal como se reporta en otros estudios similares para productos naturales, como los de Langfield RD et al. 2004 y Sarker SD et al. 2007 para bacterias ^(211 y 212), Monteiro MC et al. 2012 para *Aspergillus fumigatus* ⁽²¹³⁾.

En cuanto al tamaño de inóculo que en el caso de la *Candida albicans*, no representó ningún problema ya que se trabajó siguiendo la metodología del CLSI; en cuanto al tamaño de inóculo para los dermatofitos se realizó una variante respecto a su preparación que difiere de la usada por el CLSI M38-A2, pero la variante aplicada de cuantificar espectrofotométricamente el inóculo de los dermatofitos en general y del *Microsporum*

canis en particular, esta corroborada por los estudios de Fernandez-Torres et al. 2002 ⁽¹⁶⁹⁾, da Silva Barros et al. 2007 ⁽²¹⁴⁾ y Biancalana FS et al. 2008 ⁽²¹⁵⁾.

En cuanto al uso de indicadores colorimétricos para el método de microdilución, se puede usar sales de tetrazolium ^(211 y 216) y resazurina. En la tesis se usó Resazurina que tiene la ventaja de ser no radiactiva, no tóxica y soluble en agua ^(168 y 217) a diferencia de las sales de tetrazolium que tienen limitada solubilidad en buffers acuosos y limitada estabilidad ⁽²¹³⁾. Por otro lado el uso de la resazurina, se priorizó respecto al colorante comercial Blue Alamar™, porque se ha demostrado que ambos reactivos tienen acción equivalente y el costo de la resazurina es menor.

En cuanto a la concentración de resazurina usada en los ensayos, mi resultado fue el esperado empleando el método desarrollado por Liu y col. ⁽¹⁶⁸⁾, donde en cada pozo se adiciona aproximadamente la resazurina al 0.001%; en cuanto a los dermatofitos seguimos con la misma concentración de resazurina evidenciando buenos resultados y que son similares a los presentados por Oliveira, el cual usa una concentración de resazurina de 0.0016% por pozo, para evaluar la susceptibilidad de extractos de plantas frente a dermatofitos del género *Trichophyton* y *Microsporum* ⁽¹⁶²⁾.

En cuanto a la preparación de las diluciones de los controles, se procedió sin ningún inconveniente, aunque actualmente la metodología actualizada del EUCAST ⁽¹¹⁸⁾, recomienda usar DMSO como disolvente de fluconazol a diferencia del agua usada en la presente tesis.

6. CONCLUSIONES

1. Todos los extractos estudiados tuvieron actividad antifúngica (halo de inhibición > 18 mm) contra *Candida albicans* ATCC 10231 y ninguno contra *Aspergillus niger* ATCC 16404 por el método de difusión en agar.
2. Mediante microdilución se determinó que 19 (79%), 18 (75%) y 24 (100 %) de los extractos investigados presentaron CMIs ≤ 1000 $\mu\text{g/mL}$, frente a *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida albicans* cepa clínica y *Microsporum canis*, respectivamente. Los extractos con la mayor actividad antifúngica fueron los de *Juglans neotropica* Diels, *Psidium guajava* y *Terminalia catappa*; con CMIs < 100 $\mu\text{g/mL}$.
3. Se determinó la presencia de compuestos fenólicos, alcaloides, flavonoides, saponinas, taninos, cumarinas y quinonas en los extractos de estudio.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Navarro Garcia VM, Gonzalez A, Fuentes M, Aviles M, Rios MY, Zepeda G, Rojas MG Antifungal activities of nine traditional Mexican medicinal plants. J Ethnopharmacol. 2003; 87(1):85-8.
- 2 Lopez SN, Castelli MV, Zacchino SA, Dominguez JN, Lobo G, Charris-Charris J, Cortes JC, Ribas JC, Devia C, Rodriguez AM, Enriz RD. In vitro antifungal evaluation and structure-activity relationships of a new series of chalcone derivatives and synthetic analogues, with inhibitory properties against polymers of the fungal cell wall. Bioorg Med Chem. 2001; 9(8): 1999-2013.
- 3 Zacchino S Estratégias para a descoberta de novos agentes antifúngicos. En: Yunes and Calixto eds. Plantas como fontes de novos medicamentos. SC, Brasil: Grifos (Ed); 2001.
- 4 Odio CM. Tratamiento antifúngico en situaciones especiales: candidiasis resistente y aspergilosis. Drugs Today (Barc). 2010; 46 Suppl C: 33-46.
- 5 Maoz M y Neeman I Antimicrobial effects of aqueous plant extracts on the fungi *Microsporum canis* and *Trichophyton rubrum* and on three bacterial species Letters in Applied Microbiology 1998; 26: 61-63.
- 6 Termentzi A, Fokialakis N, Skaltsounis AL. Natural resins and bioactive natural products thereof as potential antimicrobial agents. Curr Pharm Des. 2011; 17(13):1267-90.
- 7 Di Santo R. Natural products as antifungal agents against clinically relevant pathogens. Nat Prod Rep. 2010; 27(7):1084-98.
- 8 Desmarchelier C, Witting F. Etnomedicina y bioactividad - sixty medicinal plants from the Peruvian Amazon, ecology, ethnomedicine and bioactivity 1^{ra} ed. Lima; 2000.
- 9 Huamani Achata ME. & Ruiz Quiroz JR. Determinación de La Actividad Antifúngica contra *Candida albicans* y *Aspergillus niger* de 10 Plantas Medicinales Peruanas de 3 Departamentos del Perú [Tesis]. Facultad de Farmacia y Bioquímica UNMSM. Lima; 2005.
- 10 Fenner R, Sortino M, Rates SM, Dall'Agnol R, Ferraz A, Bernardi AP, Albring D, Nor C, von Poser G, Schapoval E, Zacchino S. Antifungal activity of some Brazilian Hypericum species. Phytomedicine. 2005; 12(3):236-40.
- 11 Estrella E. Et al. Plantas Medicinales Amazónicas: Realidad y Perspectivas Tratado de Cooperación Amazónica: Secretaría Pro Tempore Lima 1995
- 12 Haraguchi H, Kataoka S, Okamoto S, Hanafi M, Shibata K. Antimicrobial triterpenes from *Ilex integra* and the mechanism of antifungal action. Phytother Res. 1999; 13(2):151-6
- 13 Macbride, J. F. Juglandaceae, Flora of Perú Field Museum of Natural History, Botanical Series Collation: 13(2/2): 263—266
- 14 Lopez A, Hudson JB, Towers GH. Antiviral and antimicrobial activities of Colombian medicinal plants. J Ethnopharmacol. 2001; 77(2-3):189-96.
- 15 Danelutte AP, Lago JH, Young MC, Kato MJ Antifungal flavonones and prenylated hydroquinones from *Piper crassinervum* Kunth. Phytochemistry. 2003; 64: 555-559
- 16 Vasques da Silva R, Navickiene HM, Kato MJ, Bolzani Vda S, Meda CI, Young MC, Furlan M. Antifungal amides from *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. Phytochemistry. 2002; 59(5):521-7

- 17 Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez DA, Nakamura CV, Filho BP Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002; 97(7):1027-1031.
- 18 Silva Delgado H. et al. Plantas Medicinales de la Amazonía Peruana Utilizadas por los Curanderos, Chamanes y Herbolarios con fines Antiinflamatorios Marzo 1998 Iquitos Perú IPSS 140 p
- 19 Somchit MN, Reezal I, Elysha Nur I, Mutalib AR In vitro antimicrobial activity of ethanol and water extracts of *Cassia alata* J *Ethnopharmacol*. 2003; 87(1):85-8.
- 20 Kloucek P, Polesny Z, Svobodova B, Vlkova E, Kokoska L. Antibacterial screening of some Peruvian medicinal plants used in Calleria District. J *Ethnopharmacol*. 2005; 99(2):309-312.
- 21 Carpano SM, Spegazzini ED, Rossi JS, Castro MT, Debenedetti SL. Antifungal activity of *Terminalia australis*. *Fitoterapia*. 2003 Apr; 74(3):294-7.
- 22 Tchakam PD, Lunga PK, Kowa TK, Lonfouo AH, Wabo HK, Tapondjou LA, Tané P, Kuate JR. Antimicrobial and antioxidant activities of the extracts and compounds from the leaves of *Psorospermum aurantiacum* Engl and *Hypericum lanceolatum* Lam. *BMC Complement Altern Med*. 2012; 12(1):136.
- 23 Decosterd LA, Hoffmann E, Kyburz R, Bray D, Hostettmann K. A new phloroglucinol derivative from *Hypericum calycinum* with antifungal and in vitro antimalarial activity. *Planta Med*. 1991; 57(6):548-551.
- 24 Rath G, Potterat O, Mavi S, Hostettmann K. Xanthones from *Hypericum roeperanum*. *Phytochemistry*. 1996; 43(2):513-520.
- 25 Rocha L, Marston A, Kaplan MA, Stoeckli-Evans H, Thull U, Testa B, Hostettmann K. An antifungal gamma-pyrone and xanthones with monoamine oxidase inhibitory activity from *Hypericum brasiliense*. *Phytochemistry*. 1994; 36(6):1381-1385.
- 26 Mukherjee PK, Saritha GS, Suresh B. Antimicrobial potential of two different *Hypericum* species available in India. *Phytother Res*. 2002; 16(7):692-695.
- 27 Filip R, Davicino R, Anesini C. Antifungal activity of the aqueous extract of *Ilex paraguariensis* against *Malassezia furfur*. *Phytother Res*. 2010; 24(5):715-719.
- 28 Noumi E, Snoussi M, Hajlaoui H, Valentin E, Bakhrouf A. Antifungal properties of *Salvadora persica* and *Juglans regia* L. extracts against oral *Candida* strains. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2010; 29(1):81-88.
- 29 Omar S, Lemonnier B, Jones N, Ficker C, Smith ML, Neema C, Towers GH, Goel K, Arnason JT. Antimicrobial activity of extracts of eastern North American hardwood trees and relation to traditional medicine. J *Ethnopharmacol*. 2000; 73(1-2):161-70.
- 30 Tirillini B, Velasquez ER, Pellegrino R. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Piper angustifolium*. *Planta Med*. 1996; 62(4):372-373
- 31 Navickiene HM, Alecio AC, Kato MJ, Bolzani VD, Young MC, Cavalheiro AJ, Furlan M. Antifungal amides from *Piper hispidum* and *Piper tuberculatum*. *Phytochemistry*. 2000; 55(6):621-626
- 32 Alecio AC, da Silva Bolzani V, Young MC, Kato MJ, Furlan M. Antifungal amide from leaves of *Piper hispidum*. J *Nat Prod*. 1998; 61(5):637-639
- 33 Koroishi AM, Foss SR, Cortez DA, Ueda-Nakamura T, Nakamura CV, Dias Filho BP. In vitro antifungal activity of extracts and neolignans from *Piper regnellii* against dermatophytes. J *Ethnopharmacol*. 2008; 117(2):270-277.

- 34 Jebashree HS, Kingsley SJ, Sathish ES, Devapriya D. Antimicrobial Activity of Few Medicinal Plants against Clinically Isolated Human Cariogenic Pathogens-An In Vitro Study. *ISRN Dent.* 2011; 2011:541421.
- 35 Dhiman A, Nanda A, Ahmad S, Narasimhan B. In vitro antimicrobial activity of methanolic leaf extract of *Psidium guajava* L. *J Pharm Bioallied Sci.* 2011; 3(2):226-229.
- 36 Torey A, Sasidharan S. Anti-*Candida albicans* biofilm activity by *Cassia spectabilis* standardized methanol extract: an ultrastructural study. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2011; 15(8): 875-882.
- 37 Caceres A, López B, Juárez X, del Aguila J, García S. Plants used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infections. 2. Evaluation of antifungal activity of seven American plants. *J Ethnopharmacol.* 1993; 40(3):207-213.
- 38 Caceres A, Lopez BR, Giron MA, Logemann H. Plants used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infections. 1. Screening for antimycotic activity of 44 plant extracts. *J Ethnopharmacol.* 1991; 31(3):263-276.
- 39 Fyhrquist P, Mwasumbi L, Haeggström CA, Vuorela H, Hiltunen R, Vuorela P. Ethnobotanical and antimicrobial investigation on some species of *Terminalia* and *Combretum* (Combretaceae) growing in Tanzania. *J Ethnopharmacol.* 2002; 79(2):169-177.
- 40 Baba-Moussa F, Akpagana K, Bouchet P. Antifungal activities of seven West African Combretaceae used in traditional medicine. *J Ethnopharmacol.* 1999; 66(3):335-338
- 41 Masoko P, Picard J, Eloff JN. Antifungal activities of six South African *Terminalia* species (Combretaceae). *J Ethnopharmacol.* 2005; 99(2):301-308.
- 42 Liu M, Katerere DR, Gray AI, Seidel V. Phytochemical and antifungal studies on *Terminalia mollis* and *Terminalia brachystemma*. *Fitoterapia.* 2009; 80(6):369-373
- 43 Aponte JC, Vaisberg AJ, Rojas R, Sauvain M, Lewis WH, Lamas G, Sarasara C, Gilman RH, Hammond GB. A multipronged approach to the study of Peruvian ethnomedicinal plants: a legacy of the ICBG-Peru Project. *J Nat Prod.* 2009; 72(3):524-526.
- 44 Rojas R, Bustamante B, Bauer J, Fernández I, Albán J, Lock O. Antimicrobial activity of selected Peruvian medicinal plants. *J Ethnopharmacol.* 2003; 88(2-3):199-204.
- 45 De la Cruz JP. Actividad antimicrobiana, antioxidante y determinación de la composición química mediante cromatografía de gases/espectrometría de masas (CG/EM) de los aceites esenciales de 3 especies de piper nativas del Perú [Tesis pregrado]. Facultad de Farmacia y Bioquímica UNMSM. Lima; 2012.
- 46 Kapoor K. *Illustrate Dictionary of Microbiology.* Oxford Book Company. Jaipur. 2010. Pág. 91-92.
- 47 Mueller GM & Bills GF. *Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods.* Elsevier Academic Press. Oxford. 2004. Pág. 12.
- 48 Engelkirk PG. & Duben-Engelkirk J. *Burton's microbiology for the health sciences.* 9th ed. 2011. Lippincott Williams & Wilkins .Philadelphia. Pág. 74-75.
- 49 Cowan MK. *Microbiology: A Systems Approach.* Third edition. McGraw-Hill. New York. 2012. Pág. 121-124.
- 50 Brandt ME, Lockhart SR, y Warnock DW. *Laboratory Aspects of Medical Mycology.* En Kauffman CA, Pappas PG, Sobel JD, y Dismukes WE. eds.

- Essentials of Clinical Mycology. 2nd edition. Springer Science+Business Media, LLC. 2011. New York. Pág. 3.
- 51 Molina de Diego A. Aspectos clínicos, diagnósticos y terapéuticos de las dermatofitosis. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011; 29 Suppl 3:33-9.
 - 52 Havlickova B, Czaika VA, Friedrich M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses*. 2008; 51 Suppl 4:2-15.
 - 53 Saunders CW, Scheynius A, Heitman J. *Malassezia* fungi are specialized to live on skin and associated with dandruff, eczema, and other skin diseases. *PLoS Pathog*. 2012; 8(6):e1002701.
 - 54 Gaitanis G, Magiatis P, Hantschke M, Bassukas ID, Velegraki A. The *Malassezia* genus in skin and systemic diseases. *Clin Microbiol Rev*. 2012; 25(1):106-41.
 - 55 Colombo AL, Padovan AC, Chaves GM. Current knowledge of *Trichosporon* spp. and *Trichosporonosis*. *Clin Microbiol Rev*. 2011; 24(4):682-700.
 - 56 Bonifaz A, Gómez-Daza F, Paredes V, Ponce RM. Tinea versicolor, tinea nigra, white piedra, and black piedra. *Clin Dermatol*. 2010 Mar 4;28(2):140-5.
 - 57 Ameen M. Epidemiology of superficial fungal infections. *Clin Dermatol*. 2010; 28(2):197-201.
 - 58 Bordel MT, Polo A, Torrero MV, Miranda A, y Vega J. Contribución al estudio epidemiológico de las dermatofitosis en el área este de Valladolid. *Actas Dermosifiliogr*. 2002; 93(8):495-9.
 - 59 Kelly BP. Superficial fungal infections. *Pediatr Rev*. 2012; 33(4):e22-37.
 - 60 Baldo A, Monod M, Mathy A, Cambier L, Bagut ET, Defaweux V, Symoens F, Antoine N, Mignon B. Mechanisms of skin adherence and invasion by dermatophytes. *Mycoses*. 2012; 55(3):218-23.
 - 61 Vidotto V, Garcia R; Ponce LM, Valverde M; Bruatto M. Dermatophytoses in Cusco (Peru). *Mycoses*. 1991; 34:183-186.
 - 62 Kim J, Sudbery P. *Candida albicans*, a major human fungal pathogen. *J Microbiol*. 2011; 49(2):171-7.
 - 63 Gow NA, van de Veerdonk FL, Brown AJ, Netea MG. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nat Rev Microbiol*. 2011; 10(2):112-22.
 - 64 Niimi M, Firth NA, Cannon RD. Antifungal drug resistance of oral fungi. *Odontology*. 2010; 98(1):15-25.
 - 65 Moyes DL, Naglik JR. Mucosal immunity and *Candida albicans* infection. *Clin Dev Immunol*. 2011; 2011:346307.
 - 66 Pfaller MA. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *Am J Med*. 2012; 125(1 Suppl):S3-13.
 - 67 Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol Rev*. 2012; 36(2):288-305.
 - 68 Hsu LY, Wijaya L, Shu-Ting Ng E, Gotuzzo E. Tropical fungal infections. *Infect Dis Clin North Am*. 2012; 26(2):497-512.
 - 69 Queiroz-Telles F, Nucci M, Colombo AL, Tobón A, Restrepo A. Mycoses of implantation in Latin America: an overview of epidemiology, clinical manifestations, diagnosis and treatment. *Med Mycol*. 2011; 49(3):225-36.
 - 70 Correia RT, Valente NY, Criado PR, Martins JE. Chromoblastomycosis: study of

- 27 cases and review of medical literature. *An Bras Dermatol*. 2010; 85(4):448-54.
- 71 Holechek S, Casquero J, Zurita S, Guevara J, Montoya Y. Variabilidad genética en cepas de *Sporothrix schenckii* aisladas en Abancay, Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2004; 21(2): 87-91.
 - 72 Pappas PG, Tellez I, Deep AE, Nolasco D, Holgado W, Bustamante B. Sporotrichosis in Peru: description of an area of hyperendemicity. *Clin Infect Dis*. 2000; 30(1):65-70.
 - 73 Ramírez-Soto MC, Andagua-Castro J, Lizárraga-Trujillo J, Aguilar-Ancori EG, Pezo-Ochoa JD. Esporotricosis en pacientes que acuden a un centro médico de referencia en Abancay, Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2011; 28(3):508-12.
 - 74 Echeverria PM, Kett DH, Azoulay E. Candida prophylaxis and therapy in the ICU. *Semin Respir Crit Care Med*. 2011; 32(2):159-73.
 - 75 Szabo EK, MacCallum DM. The contribution of mouse models to our understanding of systemic candidiasis. *FEMS Microbiol Lett*. 2011; 320(1):1-8.
 - 76 Cuenca-Estrella M, Bassetti M, Lass-Flörl C, Ráčil Z, Richardson M, Rogers TR. Detection and investigation of invasive mould disease. *J Antimicrob Chemother*. 2011; 66 Suppl 1:i15-24.
 - 77 Vandeputte P, Ferrari S, Coste AT. Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. *Int J Microbiol*. 2012; 2012:713687.
 - 78 OMS-UICN-WWF. Directrices sobre la conservación de plantas medicinales. Organización Mundial de la Salud (OMS). Unión internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) and Worldlife Fund (WWF). Gland. 1993. pp 55.
 - 79 Catálogo General de Medicamentos. Consejo General de Colegios de Farmacéuticos. Madrid. 2008.
 - 80 Alonso, Jorge. Tratado de Fitofármacos y Nutracéuticos. Edit. Corpus. Buenos Aires. 2007.
 - 81 Baulies G. & Torres RM. Actualización en fitoterapia y plantas medicinales. FMC. 2012; 19(3):149-60.
 - 82 WHO. The Promotion and Development of Traditional Medicine, Ed. WHO, Technical Report Series, No. 622, Ginebra. 1978.
 - 83 Brack Egg Antonio Diccionario Enciclopédico de plantas útiles del Perú. Cuzco: CBC; 1999.
 - 84 Škrovánková S, Mišurcová L, Machů L. Antioxidant activity and protecting health effects of common medicinal plants. *Adv Food Nutr Res*. 2012; 67:75-139
 - 85 Recio MC, Andujar I, Rios JL. Anti-inflammatory agents from plants: progress and potential. *Curr Med Chem*. 2012; 19(14):2088-2103.
 - 86 Kumar D, Kumar A, Prakash O. Potential antifertility agents from plants: a comprehensive review. *J Ethnopharmacol*. 2012; 140(1):1-32.
 - 87 Perry E, Howes MJ. Medicinal plants and dementia therapy: herbal hopes for brain aging? *CNS Neurosci Ther*. 2011; 17(6):683-98
 - 88 Sarris J, Panossian A, Schweitzer I, Stough C, Scholey A. Herbal medicine for depression, anxiety and insomnia: a review of psychopharmacology and clinical evidence. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2011; 21(12):841-860.
 - 89 Mondal S, Bandyopadhyay S, Ghosh MK, Mukhopadhyay S, Roy S, Mandal C. Natural products: promising resources for cancer drug discovery. *Anticancer Agents Med Chem*. 2012; 12(1):49-75.

- 90 Kumar S, Gupta P, Sharma S, Kumar D. A review on immunostimulatory plants. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao*. 2011; 9(2):117-128.
- 91 Domingues A, Sartori A, Valente LM, Golim MA, Siani AC, Viero RM. *Uncaria tomentosa* aqueous-ethanol extract triggers an immunomodulation toward a Th2 cytokine profile. *Phytother Res*. 2011; 25(8):1229-35.
- 92 Oliveira AB, Dolabela MF, Braga FC, Jácome RL, Varotti FP, Póvoa MM. Plant-derived antimalarial agents: new leads and efficient phythomedicines. Part I. Alkaloids. *An Acad Bras Cienc*. 2009; 81(4):715-40.
- 93 Abreu AC, McBain AJ, Simões M. Plants as sources of new antimicrobials and resistance-modifying agents. *Nat Prod Rep*. 2012; 29(9):1007-21.
- 94 Sova M. Antioxidant and antimicrobial activities of cinnamic acid derivatives. *Mini Rev Med Chem*. 2012; 12(8):749-767
- 95 Negi PS. Plant extracts for the control of bacterial growth: efficacy, stability and safety issues for food application. *Int J Food Microbiol*. 2012; 156(1):7-17.
- 96 Kuorwel KK, Cran MJ, Sonneveld K, Miltz J, Bigger SW. Essential oils and their principal constituents as antimicrobial agents for synthetic packaging films. *J Food Sci*. 2011; 76(9):R164-77.
- 97 Gooda Sahib N, Saari N, Ismail A, Khatib A, Mahomoodally F, Abdul Hamid A. Plants' metabolites as potential antiobesity agents. *ScientificWorldJournal*. 2012; 2012:436039.
- 98 Taylor CB. Defense responses in plants and animals-more of the same. *Plant Cell*. 1998; 10: 873-876.
- 99 Osbourn AE. Antimicrobial phytoprotectans and fungal pathogens: a commentary. *Fungal Genet Biol*. 1999; 26: 163-168
- 100 Gurgel LA, Sidrim JJ, Martins DT, Cechinel Filho V, Rao VS. In vitro antifungal activity of dragon's blood from *Croton urucurana* against dermatophytes. *J Ethnopharmacol*. 2005; 97(2):409-412
- 101 Boulogne I, Petit P, Ozier-Lafontaine H, Desfontaines L, Loranger-Merciris G. Insecticidal and antifungal chemicals produced by plants: a review. *Environ Chem Lett*. 2012; 10(4): 325-347
- 102 Arif T, Bhosale JD, Kumar N, Mandal TK, Bendre RS, Lavekar GS, Dabur R. Natural products--antifungal agents derived from plants. *J Asian Nat Prod Res*. 2009; 11(7):621-38.
- 103 Braga FG, Bouzada MLM, Fabri RL, Matos MO, Moreira FO, Scio E, Coimbra ES. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. *J Ethnopharmacol*. 2007; 111(2):396-402
- 104 Alanís-Garza BA, González-González GM, Salazar-Aranda R, Waksman de Torres N, Rivas-Galindo VM. Screening of antifungal activity of plants from the northeast of Mexico. *J Ethnopharmacol*. 2007; 114(3):468-71.
- 105 Sardi JC, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida AM, Mendes Giannini MJ. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J Med Microbiol*. 2013; 62(Pt 1):10-24.
- 106 Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev*. 1999; 12(4):564-582.
- 107 Carson CF, Hammer KA, Riley TV. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clin Microbiol Rev*. 2006; 19(1):50-

62.

- 108 Goncagul G, Ayaz E. Antimicrobial effect of garlic (*Allium sativum*). *Recent Pat Antiinfect Drug Discov*. 2010; 5(1):91-93.
- 109 World Health Organization. *Folium Eucalyti*. WHO monographs on selected medicinal plants. WHO Graphics. Ginebra. 2002; 106-113.
- 110 Centeno S, Calvo MA, Adelantado C, Figueroa S. Antifungal activity of extracts of *Rosmarinus officinalis* and *Thymus vulgaris* against *Aspergillus flavus* and *A. ochraceus*. *Pak J Biol Sci*. 2010; 13(9):452-455.
- 111 Soković MD, Vukojević J, Marin PD, Brkić DD, Vajs V, van Griensven LJ. Chemical composition of essential oils of *Thymus* and *Mentha* species and their antifungal activities. *Molecules*. 2009; 14(1):238-49.
- 112 Desbois AP, Tschörner D, Coote PJ. Survey of small antifungal peptides with chemotherapeutic potential. *Curr Pharm Biotechnol*. 2011; 12(8):1263-91.
- 113 Stevens DA, Calderon L, Martinez M, Clemons KV, Wilson SJ, Selitrennikoff CP. Zeamatin, clotrimazole and nikkomycin Z in therapy of a *Candida vaginitis* model. *J Antimicrob Chemother*. 2002; 50(3):361-364.
- 114 Johnson EM. Issues in antifungal susceptibility testing. *J Antimicrob Chemother*. 2008; 61 Suppl 1: i13-i18.
- 115 Rex JH, Pfaller MA, Walsh TJ, Chaturvedi V, Espinel-Ingroff A, Ghannoum MA, Gosey LL, Odds FC, Rinaldi MG, Sheehan DJ, Warnock DW. Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. *Clin Microbiol Rev*. 2001; 14(4): 643-58.
- 116 Clinical Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard NCCLS document M27-A2. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standard; 2002.
- 117 Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). EUCAST definitive document EDef 7.1: method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts. *Clin Microbiol Infect*. 2008; 14(4):398-405
- 118 Arendrup MC, Cuenca-Estrella M, Lass-Flörl C, Hope W; EUCAST-AFST. EUCAST technical note on the EUCAST definitive document EDef 7.2: method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts EDef 7.2 (EUCAST-AFST). *Clin Microbiol Infect*. 2012; 18(7):E246-7.
- 119 Clinical Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard CLSI document M38-A2. Wayne, PA: Clinical Laboratory Standards Institute. 2008.
- 120 Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST Technical Note on the method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia-forming moulds. *Clin Microbiol Infect*. 2008; 14(10):982-984.
- 121 Clinical Laboratory Standards Institute.. Methods for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts: approved standard M44-A. CLSI, Wayne,PA, USA, 2009

- 122 Arikan S. Current status of antifungal susceptibility testing methods. *Med Mycol.* 2007; 45(7):569-87.
- 123 Ranque S, Lachaud L, Gari-Toussaint M, Michel-Nguyen A, Mallié M, Gaudart J, Bertout S. Interlaboratory reproducibility of Etest amphotericin B and caspofungin yeast susceptibility testing and comparison with the CLSI method. *J Clin Microbiol.* 2012; 50(7):2305-9.
- 124 Pfaller MA, Castanheira M, Diekema DJ, Messer SA, Moet GJ, Jones RN. Comparison of European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) and Etest methods with the CLSI broth microdilution method for echinocandin susceptibility testing of *Candida* species. *J Clin Microbiol.* 2010; 48(5):1592-1599.
- 125 Lass-Flörl C, Perkhofer S, Mayr A. In vitro susceptibility testing in fungi: a global perspective on a variety of methods. *Mycoses.* 2010; 53(1):1-11.
- 126 Pfaller MA, Chaturvedi V, Diekema DJ, Ghannoum MA, Holliday NM, Killian SB, Knapp CC, Messer SA, Miskou A, Ramani R. Comparison of the Sensititre YeastOne colorimetric antifungal panel with CLSI microdilution for antifungal susceptibility testing of the echinocandins against *Candida* spp., using new clinical breakpoints and epidemiological cutoff values. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012; 73(4):365-368.
- 127 Carrillo-Muñoz AJ, Quindós G, Ruesga M, del Valle O, Pemán J, Cantón E, Hernández-Molina JM, Santos P. In vitro antifungal susceptibility testing of filamentous fungi with Sensititre Yeast One. *Mycoses.* 2006;49(4):293-297.
- 128 Vijgen S, Nys S, Naesens R, Magerman K, Boel A, Cartuyvels R. Comparison of Vitek identification and antifungal susceptibility testing methods to DNA sequencing and Sensititre Yeast One antifungal testing. *Med Mycol.* 2011; 49(1):107-10.
- 129 López Lillo A & Sánchez de Lorenzo Cáceres JM. *Arboles en España Manual de identificación* 2ª edición Madrid: Ed. Mundi-Prensa; 2001.
- 130 Ulloa C & Moller P. Trees and shrubs of the Andes of Ecuador. [citado 25 jul 2012]. http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=201&taxon_id=116180
- 131 El-Seedi HR, Ringbom T, Torssell K, Bohlin L. Constituents of *Hypericum laricifolium* and their cyclooxygenase (COX) enzyme activities. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 2003; 51(12):1439-40.
- 132 Flora of the Andes Clusiaceae Clusiáceas. [citado 23 Set 2012]. Disponible en http://www.sacha.org/famil/a_to_m/clusi.htm
- 133 Barnes J, Anderson LA, Phillipson JD. St John's wort (*Hypericum perforatum* L.): a review of its chemistry, pharmacology and clinical properties. *J Pharm Pharmacol.* 2001; 53(5):583-600.
- 134 *Hypericum laricifolium*. Tropicos.org. [citado 30 Jun 2012]. Disponible en: <http://www.tropicos.org/Name/7800302>
- 135 Briceño Benito & Morillo Gilberto Catálogo Abreviado de las Plantas con Flores de los Páramos de Venezuela. Parte I. Dicotiledóneas (Magnoliopsida) *Acta Bot. Venez.* 2002; 25(1).
- 136 Ruiz Urbina MH. Estudio de la Actividad Antibacteriana y Antiviral de *Hypericum laricifolium* del Perú [Tesis]. Facultad de Farmacia y Bioquímica UNMSM. Lima; 2003.
- 137 Soukup Jaroslav Vocabulario de los nombres vulgares de la flora Peruana. Lima: Colegio Salesiano; 1971.

- 138 INIA. ANEXO 7 Plantas nativas utilizadas con fines medicinales. En Perú: Informe Nacional para la Conferencia Técnica Internacional de la FAO sobre los Recursos Filogenéticos. Lima. 1995. [citado 01 Jul 2012]. Disponible en: <http://www.inia.gob.pe/genetica/informes/Informe%20Estado%20de%20los%20RF%20Per%C3%BA%201996.pdf>
- 139 Ceroni Stuva Aldo Datos etnobotánicos del poblado de Huaylingas. Cuenca la gallega. Morropon. Piura. Ecología Aplicada. 2002; 1(1).
- 140 Aquifoliaceae. Wikipedia. [citado 22 Jun 2012]. Disponible en: <http://es.wikipedia.org/wiki/Aquifoliaceae>.
- 141 Stevens, P.F. 2001 en adelante. Angiosperm Phylogeny Website. Version 9, June 2008. [citado 22 Jun 2012]. Disponible en: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>.
- 142 Ilex. Wikipedia.[citado 22 Jun 2012].Disponible en: <http://es.wikipedia.org/wiki/Ilex>
- 143 Guayusa. Ecoaldea. [citado 25 Jun 2012]. Disponible en: <http://www.ecoaldea.com/plmd/guayusa.htm>
- 144 *Ilex guayusa*. Tropicos.org.. Missouri Botanical Garden. [citado 25 Jun 2012]. Disponible en: 30 Jun 2012 <http://www.tropicos.org/Name/2000086>
- 145 *Juglans neotropica* Diels. Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. [citado 25 Jun 2012]. Disponible en: <http://www.tropicos.org/Name/16700014>
- 146 Vasquez M.R. y R.R.Gonzales (2002). Flora Virtual de la Amazonia Peruana: Clave de Identificación de Angiospermas y Gimnospermas Website. Version 1, Agosto 2002. [citado 28 Jun 2012]. Disponible en: <http://www.oocities.com/gymanperu>
- 147 Trelease, W. & T. G. Yuncker, 1950. Piperac. N. South Amer., p. 110 Missouri Botanical Garden - TROPICOS Bibliography Data Base
- 148 Arroyo Acevedo J.L. Efectos del extracto acuoso de las hojas de *Piper angustifolium* R&P (Matico) sobre la úlcera gástrica en animales de experimentación [Tesis doctoral]. Facultad de Farmacia y Bioquímica UNMSM. Lima; 1998.
- 149 Parmar, V.S., Jain, S.C., Bisht, K.S., Jain, R., Taneja, P., Jha, A., Tyagi, O.M., Prasad, A.K., Wengel, J., Olsen, C.E., Boll, P.M., Phytochemistry of genus Piper. Phytochemistry 1997; 46:597–673.
- 150 Palacios Vaccaro, Julio Plantas Medicinales Nativas del Perú – II. Lima: CONCYTEC; 1996.
- 151 *Piper lineatum*. Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. [citado 25 Jun 2012]. Disponible en: <http://www.tropicos.org/Name/25000693>
- 152 Vázquez-Yanes, C., A. I. Batis Muñoz, M. I. Alcocer Silva, M. Gual Díaz y C. Sánchez Dirzo. 1999. Árboles y arbustos potencialmente valiosos para la restauración ecológica y la reforestación. Reporte técnico del proyecto J084. CONABIO - Instituto de Ecología, UNAM. Pag. 201-204.
- 153 Martínez M.J. et al. Evaluación de la actividad antimicrobiana del *Psidium guajava* L. (guayaba) Rev Cubana de Plant Med 1997; 2(1): 12-14.
- 154 Carvalho, A. de A.T., M.C.C. Sampaio, F.C. Sampaio, A.F.M. de Melo, K.X. da F.R. de Sena, A. de A. Chiappeta & J.S. HiginoTavares Actividade Antimicrobiana in vitro de Extratos Hidroalcoólicos de *Psidium guajava* L. sobre Bactérias Gram-Negativas Acta Farm. Bonaerense 2002; 21 (4): 255-258.
- 155 Oh WK, Lee CH, Lee MS, Baea EY, Sohn CB, Oh H, Kim BY, Ahn JS Antidiabetic effects of extracts from *Psidium guajava* Journal of Ethnopharmacology 2005; 96

(3): 411–415.

- 156 Tormo Molina Rafael Universidad de Extremadura. Dpto. Botánica. Lecciones hipertextuales de Botánica Fabaceae ESPAÑA [citado 2 Set 2011]. Disponible en: <http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/ibc99/botanica/botanica/fabaceae.htm>
- 157 Rodrigues RS, Flores AS, Miiotto STS, Baptista LRM. O genero *Senna* (Leguminosae, Caesalpinioideae) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Acta Bot Bras.** 2005; 19(1): 1-16.
- 158 López R, Navarro JA, Montero MI, Rodríguez M. 2007. *Senna reticulata*(Willd.) H.S. Irwin & Barneby. [citado 30 de junio 2012] <http://www.siac.net.co/sib/catalogoespecies/especie.do?idBuscar=404&method=displayAAT>
- 159 *Senna reticulata*. Tropicos.org. [citado 30 Jun 2012]. Disponible en: <http://www.tropicos.org/Name/13041488>
- 160 Santos RN, Braz Filho R, Silva MGV. Constituintes quimicos do caule de *Senna reticulata* Willd. (Leguminosae). Quim Nova. 2008; 31(8): 1979-1981.
- 161 Pérez RA & Aguilar S. El Parque Nacional Sarigua-Panamá. Smithsonian Tropical Research Institute. [citado 30 Jun 2012]. Disponible en: <http://biogeodb.stri.si.edu/bioinformatics/sarigua/species/93>.
- 162 Oliveira AH. Atividade Antimicrobiana e Imunológica in vitro dos extratos de *Senna reticulata* (Willd.) Irwin & Barneby (mata-pasto) e *Vismia guianensis* (Aubl.) (lacre). Tesis Mestrado em Ciências Farmacêuticas. 2009. Universidade Estadual Paulista. Araraquara.
- 163 Combretaceae. Wikipedia. [citado 25 Jun 2012]. Disponible en: <http://es.wikipedia.org/wiki/Combretaceae>
- 164 Terminalia. Wikipedia. [citado 29 Jun 2012]. Disponible en: <http://es.wikipedia.org/wiki/Terminalia>
- 165 *Red Nacional de Jardines Botánicos*. 2008. *Terminalia catappa*L.. [citado 29 Jun 2012].Disponible en:<http://www.siac.net.co/sib/catalogoespecies/especie.do?idBusca r=1138&method=displayAAT>
- 166 *Terminalia catappa*. Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. [citado 01 Jul 2012]. Disponible en: <http://www.tropicos.org/Name/8200173>
- 167 Lock O. Investigación Fitoquímica. Fondo Editorial de la PUCP. Lima. 2004
- 168 Liu M, Seidel V, Gray AI. Colorimetric broth microdilution method for the antifungal screening of plant extracts against yeasts. *Methods*. 2007; 42:325-329.
- 169 Fernández-Torres B, Cabañes FJ, Carrillo-Muñoz A, Esteban A, Inza I, Abarca L, Guarro J. Collaborative evaluation of optimal Antifungal susceptibility testing conditions for dermatophytes *J Clin Microbiol* 2002; 40(11): 3999-4003
- 170 Wiegand I, Hilpert K, Hancock RE. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat Protoc*. 2008; 3(2):163-175.
- 171 Tocci N, D'Auria FD, Simonetti G, Panella S, Palamara AT, Pasqua G. A three-step culture system to increase the xanthone production and antifungal activity of *Hypericum perforatum* subsp. *angustifolium* in vitro roots. *Plant Physiol Biochem*. 2012; 57: 54-58.
- 172 Crockett SL, Poller B, Tabanca N, Pferschy-Wenzig EM, Kunert O, Wedge DE, Bucar F. Bioactive xanthones from the roots of *Hypericum perforatum* (common St John's wort). *J Sci Food Agric*. 2011; 91(3):428-34.

- 173 Saddiqe Z, Naeem I, Maimoona A. A review of the antibacterial activity of *Hypericum perforatum* L. J Ethnopharmacol. 2010; 131(3):511-21.
- 174 Conforti F, Statti GA, Tundis R, Bianchi A, Agrimonti C, Sacchetti G, Andreotti E, Menichini F, Poli F. Comparative chemical composition and variability of biological activity of methanolic extracts from *Hypericum perforatum* L. Nat Prod Res. 2005; 19(3):295-303.
- 175 Filip R, Davicino R, Anesini C. Antifungal activity of the aqueous extract of *Ilex paraguariensis* against *Malassezia furfur*. Phytother Res. 2010; 24(5):715-9.
- 176 Burris KP, Davidson PM, Stewart CN Jr, Zivanovic S, Harte FM. Aqueous extracts of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) as a natural antimicrobial against *Escherichia coli* O157:H7 in a microbiological medium and pH 6.0 apple juice. J Food Prot. 2012; 75(4):753-7.
- 177 Müller V, Chávez JH, Reginatto FH, Zucolotto SM, Niero R, Navarro D, Yunes RA, Schenkel EP, Barardi CR, Zanetti CR, Simões CM. Evaluation of antiviral activity of South American plant extracts against herpes simplex virus type 1 and rabies virus. Phytother Res. 2007; 21(10):970-974.
- 178 Noumi E, Snoussi M, Hajlaoui H, Valentin E, Bakhrouf A. Antifungal properties of *Salvadora persica* and *Juglans regia* L. extracts against oral *Candida* strains. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2010; 29(1):81-8.
- 179 Pereira JA, Oliveira I, Sousa A, Ferreira IC, Bento A, Estevinho L. Bioactive properties and chemical composition of six walnut (*Juglans regia* L.) cultivars. Food Chem Toxicol. 2008; 46(6):2103-11.
- 180 Ali-Shtayeh MS, Abu Ghdeib SI. Antifungal activity of plant extracts against dermatophytes. Mycoses. 1999; 42(11-12):665-672.
- 181 Ficker CE, Arnason JT, Vindas PS, Alvarez LP, Akpagana K, Gbeassor M, De Souza C, Smith ML. Inhibition of human pathogenic fungi by ethnobotanically selected plant extracts. Mycoses 2003; 46(1-2):29-37.
- 182 Ruiz JR, Roque M. Actividad antimicrobiana de 4 plantas de nor-oriente peruano. *Ciencia e Investigación* 2009; 12(1): 41-47
- 183 Bhadauria S, Kumar P. Broad spectrum antidermatophytic drug for the control of tinea infection in human beings. Mycoses. 2012; 55(4):339-43.
- 184 Koroishi AM, Foss SR, Cortez DA, Ueda-Nakamura T, Nakamura CV, Dias Filho BP. In vitro antifungal activity of extracts and neolignans from *Piper regnellii* against dermatophytes. J Ethnopharmacol. 2008; 117(2):270-7.
- 185 Chakor JN, Musso L, Sardi P. Synthesis and structure-activity relationships of antifungal crassinervic acid analogs. Chem Biodivers. 2012; 9(1):41-7.
- 186 Lago JH, Ito AT, Fernandes CM, Young MC, Kato MJ. Secondary metabolites isolated from *Piper chimonantifolium* and their antifungal activity. Nat Prod Res. 2012; 26(8):770-3.
- 187 Tirillini B, Velasquez ER, Pellegrino R. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Piper angustifolium*. Planta Med 1996; 62(4): 372-373.
- 188 Marques JV, Kitamura RO, Lago JH, Young MC, Guimarães EF, Kato MJ. Antifungal amides from *Piper scutifolium* and *Piper hoffmanseggianum*. J Nat Prod. 2007; 70(12):2036-2039.
- 189 Navickiene HM, Alecio AC, Kato MJ, Bolzani VD, Young MC, Cavaleiro AJ, et al. Antifungal amides from *Piper hispidum* and *Piper tuberculatum*. Phytochemistry 2000; 55(6): 621-6.

- 190 Alecio AC, da Silva Bolzani V, Young MC, Kato MJ, Furlan 25. M. Antifungal amide from leaves of *Piper hispidum*. J Nat Prod 1998; 61(5): 637-9
- 191 Lopez A, Ming DS, Towers GH. Antifungal activity of 26. benzoic acid derivatives from *Piper lanceaefolium*. J Nat Prod 2002; 65(1):62-64.
- 192 da Silva JK, Andrade EH, Kato MJ, Carreira LM, Guimarães EF, Maia JG. Antioxidant capacity and larvicidal and antifungal activities of essential oils and extracts from *Piper krukoffii*. Nat Prod Commun. 2011 Sep;6(9):1361-6.
- 193 Koroishi AM, Foss SR, Cortez DA, Ueda-Nakamura T, Nakamura CV, Dias Filho BP. In vitro antifungal activity of extracts and neolignans from *Piper regnellii* against dermatophytes. J Ethnopharmacol. 2008; 117(2):270-7.
- 194 Li XC, Ferreira D, Jacob MR, Zhang Q, Khan SI, ElSohly 28. HN, *et al.* Antifungal cyclopentenodiones from *Piper coruscans* J Am Chem Soc 2004, 126(22): 6872-6873.
- 195 Dhiman A, Nanda A, Ahmad S. Metal analysis in citrus sinensis fruit peel and *Psidium guajava* leaf. Toxicol Int. 2011; 18(2):163-167.
- 196 Alves PM, Queiroz LM, Pereira JV, Pereira Mdo S. In vitro antimicrobial, antiadherent and antifungal activity of Brazilian medicinal plants on oral biofilm microorganisms and strains of the genus *Candida*. Rev Soc Bras Med Trop. 2009; 42(2):222-4.
- 197 Camacho-Hernández IL, Cisneros-Rodríguez C, Uribe-Beltrán MJ, Ríos-Morgan A, Delgado-Vargas F. Antifungal activity of fruit pulp extract from *Psidium sartorianum*. Fitoterapia. 2004; 75(3-4):401-404.
- 198 Dhiman A, Nanda A, Ahmad S, Narasimhan B. In vitro antimicrobial activity of methanolic leaf extract of *Psidium guajava* L. J Pharm Bioallied Sci. 2011; 3(2):226-229.
- 199 Huang J, Zhang Z. Microwave-assisted extraction of quercetin and acid degradation of its glycosides in *Psidium guajava* leaves. Anal Sci. 2004; 20(2):395-397.
- 200 Li J, Chen F, Luo J. [Article in Chinese] [GC-MS analysis of essential oil from the leaves of *Psidium guajava*] Zhong Yao Cai. 1999; 22(2):78-80.
- 201 Ogundare OA. The antimicrobial pattern and phytochemical properties of the leaf extracts of *Senna podocarpa*. African J Mic Research. 2009; 3(7):400-406.
- 202 Noguera LG. *Senna macranthera*: constituição química e atividades biológicas. Tesis de mestrado em Ciencias Biológicas. Universidade Federal de Juiz de Fora. 2009. Juiz de Fora.
- 203 Doughari JH, El-Mahmood AM, Tyoyina I. Antimicrobial activity of leaf extracts of *Senna obtusifolia* (L.). African J Pharm Pharmacol. 2008; 2(1):7-13.
- 204 Duraipandiyan V, Ignacimuthu S. Antibacterial and antifungal activity of *Cassia fistula* L.: an ethnomedicinal plant. J Ethnopharmacol. 2007; 112(3):590-594.
- 205 Nair R, Chanda S. Antimicrobial Activity of *Terminalia catappa*, *Manilkara zapota* and *Piper betel* Leaf Extract. Indian J Pharm Sci. 2008; 70(3):390-393.
- 206 Aneja KR, Sharma C, Joshi R. Antimicrobial activity of *Terminalia arjuna* Wight & Arn.: an ethnomedicinal plant against pathogens causing ear infection. Braz J Otorhinolaryngol. 2012; 78(1):68-74.
- 207 Mann A, Banso A, Clifford LC. An antifungal property of crude plant extracts from *Anogeissus leiocarpus* and *Terminalia avicennioides*. Tanzan J Health Res. 2008; 10(1):34-8.

- 208 Valsaraj R, Pushpangadan P, Smitt UW, Adersen A, Christensen SB, Sittie A, Nyman U, Nielsen C, Olsen CE. New anti-HIV-1, antimalarial, and antifungal compounds from *Terminalia bellerica*. J Nat Prod. 1997; 60(7):739-42.
- 209 Scorzoni L, Benaducci T, Almeida AMF, Silva DHS, Bolzani VS, Mendes-Giannini MJS. The use of standard methodology for determination of antifungal activity of natural products against medical yeast *Candida* sp y *Cryptococcus* sp. Braz J Microbiol. 2007; 38: 391-397.
- 210 Jacob MR, Walker LA. Natural products and antifungal drug discovery. Methods Mol Med. 2005; 118:83-109
- 211 Langfield RD, Scarano FJ, Heitzman ME, Kondo M, Hammond GB, Neto CC. Use of a modified microplate bioassay method to investigate antibacterial activity in the Peruvian medicinal plant *Peperomia galioides*. J Ethnopharmacol. 2004; 94(2-3):279-281.
- 212 Sarker SD, Nahar L, Kumarasamy Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. Methods. 2007; 42(4):321-324.
- 213 Monteiro MC, de la Cruz M, Cantizani J, Moreno C, Tormo JR, Mellado E, De Lucas JR, Asensio F, Valiente V, Brakhage AA, Latgé JP, Genilloud O, Vicente F. A new approach to drug discovery: high-throughput screening of microbial natural extracts against *Aspergillus fumigatus* using resazurin. J Biomol Screen. 2012; 17(4):542-549.
- 214 da Silva Barros ME, de Assis Santos D, Hamdan JS. Evaluation of susceptibility of *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum* clinical isolates to antifungal drugs using a modified CLSI microdilution method (M38-A). J Med Microbiol. 2007; 56(Pt 4):514-8.
- 215 Biancalana FS, Telles PF, Lyra L, Schreiber AZ. Preanalytical conditions for broth microdilution antifungal susceptibility of *Microsporium spp.* Mycoses. 2008; 51(4):313-7.
- 216 Al-Bakri AG, Afifi FU. Evaluation of antimicrobial activity of selected plant extracts by rapid XTT colorimetry and bacterial enumeration. J Microbiol Methods. 2007; 68(1):19-25.
- 217 Mania D, Hilpert K, Ruden S, Fischer R, Takeshita N. Screening for antifungal peptides and their modes of action in *Aspergillus nidulans*. Appl Environ Microbiol. 2010; 76(21):7102-8.

8. ANEXOS

ANEXO 1: Material Biológico, reactivos y medios de cultivo

MATERIAL BIOLÓGICO

- *Candida albicans* ATCC 10231
- *Candida albicans* cepa clínica
- *Aspergillus niger* ATCC 16404
- *Microsporum canis* Cepa clínica

REACTIVOS

- Etanol 95 % (Merck)
- Metanol absoluto (Merck)
- Agua destilada
- Dimetilsulfóxido (Merck)
- Ketoconazol (donados por Hersil, potencia 99,90% y fecha de vencimiento: 1-10-13)
- Fluconazol (donados por Hersil, potencia 99,20% y fecha de vencimiento: 30-3-13)
- Resazurina(Sigma-Aldrich)

MEDIOS DE CULTIVO

- Agar Dextrosa Sabouraud al 4% (Merck)
- Caldo Dextrosa Sabourud (Merck)
- Medio RPMI 1640 con glutamina sin bicarbonato (Sigma-Aldrich)
- Buffer ácido morfolino propanosulfónico (MOPS) (Sigma-Aldrich)

Anexo 2: Constancia de identificación de las plantas

CONSTANCIA

LA DIRECTORA Y CURADORA DEL HERBARIO WEBERBAUER DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA, A TÍTULO PERSONAL DEJA CONSTANCIA QUE:

Las muestras vegetales recibidos por los señores JULIO REYNALDO RUIZ QUIROZ y MARIA ELENA HUAMANI ACHATA, tesis de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, ha sido determinada, como sigue:

1. *Annona cherimolia* Mill. (ANNONACEAE) “Chirimoya”
2. *Annona muricata* L. (ANNONACEAE) “Guanábana”
3. *Bidens pilosa* L. (ASTERACEAE) “Cadillo”
4. *Hypericum laricifolium* (CLUSIACEAE/HYPERICACEAE) “Chinchango”
5. *Juglans neotropica* Diels (JUGLANDACEAE) “Nogal”
6. *Mentzelia cordifolia* Dombey (LOASACEAE) “Amor seco”
7. *Piper spp.* (PIPERACEAE) “Matico”
8. *Plantago major* L. (PLANTAGINACEAE) “Llantén”
9. *Psidium guajava* L. (MYRTACEAE) “Guayaba”
10. *Schinus molle* L. (ANACARDIACEAE) “Molle”
11. *Spartium junceum* L. (FABACEAE) “Retama”

Determinado por: **Blga. Dra. Graciela Vilcapoma Segovia**

Se extiende la presente constancia a solicitud de los interesados, para los fines que estimen convenientes.

Lima, 19 de octubre del 2004

Dra. Graciela Vilcapoma Segovia

Anexo 3: Constancia de identificación de *Ilex guayusa* Loes



CERTIFICACIÓN BOTÁNICA

José Ricardo Campos de la Cruz, Biólogo Colegiado, C. B. P. N° 3796:

Certifica.

Que: El Sr. **JULIO REYNALDO RUIZ QUIROZ**, ha solicitado la determinación científica de una planta conocida con el nombre vernacular de "guayusa". La muestra ha sido estudiada y determinada científicamente como: **Ilex guayusa** Loes. Según el Sistema de Clasificación de Arthur Cronquist et al 1981, ocupa las siguientes categorías taxonómicas.

DIVISIÓN	: MAGNOLIOPHYTA
CLASE	: MAGNOLIOPSIDA
SUBCLASE	: ROSIDAE
ORDEN	: CELASTRALES
FAMILIA	: AQUIFOLIACEAE
GENERO	: <u>Ilex</u> L.
ESPECIE	: <u>Ilex guayusa</u> Loes.

Nombre vernacular: "GUAYUSA"

Se expide la presente certificación para los fines que se estime conveniente.

Lima, 07 de abril del 2007



J. Campos de la Cruz
José R. Campos De la Cruz
BIOLOGO
C.B.P. 3796

JIRÓN SÁNCHEZ SILVA N° 156. URBANIZACIÓN SANTA LUZMILA-LIMA

Anexo 4: Constancia de identificación de *Piper lineatum* Ruiz & Pav.

JOSÉ R. CAMPOS DE LA CRUZ
CONSULTOR BOTÁNICO
C. B. P. N° 3796
Teléfono: 537 3629
e-mail: joricampos@yahoo.es



CERTIFICACIÓN BOTÁNICA

José Ricardo Campos de la Cruz, Biólogo Colegiado, C. B. P. N° 3796:

Certifica.

Que: El Sr. **JULIO REYNALDO RUIZ QUIROZ**, ha solicitado la determinación científica de una planta conocida con el nombre vernacular de “**matico**”. La muestra ha sido estudiada y determinada científicamente como: **Piper lineatum Ruiz & Pav.** Según el Sistema de Clasificación de Arthur Cronquist et al 1981, ocupa las siguientes categorías taxonómicas.

DIVISIÓN	: MAGNOLIOPHYTA
CLASE	: MAGNOLIOPSIDA
SUBCLASE	: MAGNOLIIDAE
ORDEN	: PIPERALES
FAMILIA	: PIPERACEAE
GENERO	: <u>Piper L.</u>
ESPECIE	: <u>Piper lineatum Ruiz & Pav.</u>

Nombre vernacular: “MATICO”

Se expide la presente certificación para los fines que se estime conveniente.


Lima, 07 de abril del 2007



Joricampos
José R. Campos De la Cruz
BIOLOGO
C.B.P. 3796

JIRÓN SÁNCHEZ SILVA N° 156. URBANIZACIÓN SANTA LUZMILA-LIMA

Anexo 5: Constancia de identificación de *Senna reticulata* (Willdenow) H. Irwin & Barneby

<p>JOSÉ R. CAMPOS DE LA CRUZ CONSULTOR BOTÁNICO C. B. P. N° 3796 Teléfono: 537 3629 e-mail: joricampos@yahoo.es</p>	
---	--

CERTIFICACIÓN BOTÁNICA

José Ricardo Campos de la Cruz, Biólogo Colegiado, C. B. P. N° 3796:
Certifica.



Que: El Sr. **JULIO REYNALDO RUIZ QUIROZ**, ha solicitado la determinación científica de una planta conocida con el nombre vernacular de “retama”. La muestra ha sido estudiada y determinada científicamente como: **Senna reticulata** (Willdenow) H. Irwin & Barneby. Según el Sistema de Clasificación de Arthur Cronquist et al 1981, ocupa las siguientes categorías taxonómicas.

DIVISIÓN	: MAGNOLIOPHYTA
CLASE	: MAGNOLIOPSIDA
SUBCLASE	: ROSIDAE
ORDEN	: FABALES
FAMILIA	: FABACEAE
GENERO	: <u>Senna</u> Mill.
ESPECIE	: <u>Senna reticulata</u> (Willdenow) H. Irwin & Barneby

Nombre vernacular: “RETAMA”

Se expide la presente certificación para los fines que se estime conveniente.

Lima, 07 de abril del 2007

José R. Campos de la Cruz
BIOLOGO
C.B.P. 3796

JIRÓN SÁNCHEZ SILVA N° 156. URBANIZACIÓN SANTA LUZMILA-LIMA

Anexo 6: Constancia de identificación de *Terminalia catappa* L

JOSÉ R. CAMPOS DE LA CRUZ
CONSULTOR BOTÁNICO
C. B. P. N° 3796
Teléfono: 537 3629
e-mail: joricampos@yahoo.es



CERTIFICACIÓN BOTÁNICA

José Ricardo Campos de la Cruz, Biólogo Colegiado, C. B. P. N° 3796:

Certifica.

Que: El Sr. **JULIO REYNALDO RUIZ QUIROZ**, ha solicitado la determinación científica de una planta conocida con el nombre vernacular de "castañilla". La muestra ha sido estudiada y determinada científicamente como: **Terminalia catappa L.** Según el Sistema de Clasificación de Arthur Cronquist et al 1981, ocupa las siguientes categorías taxonómicas.

DIVISIÓN	: MAGNOLIOPHYTA
CLASE	: MAGNOLIOPSIDA
SUBCLASE	: ROSIDAE
ORDEN	: MYRTALES
FAMILIA	: COMBRETACEAE
GENERO	: <u>Terminalia</u> L
ESPECIE	: <u>Terminalia catappa</u> L.

Nombre vernacular: "CASTANILLA"

Se expide la presente certificación para los fines que se estime conveniente.

Lima, 07 de abril del 2007



José R. Campos De la Cruz
BIOLOGO
C.B.P. 3796

JIRÓN SÁNCHEZ SILVA N° 156. URBANIZACIÓN SANTA LUZMILA-LIMA